

Aus dem Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie
Direktor: Prof. Dr. Roland Lill
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Modulation der β 1-Integrin-Lokalisation an der apikalen Plasmamembran durch Galektin-3

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Ellena Hönig
aus Nürtingen

Marburg, 2017

Vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
angenommen am: 17.03. 2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent: Herr Prof. Dr. Ralf Jacob
1. Korreferent: Herr Prof. Dr. Alexander Brehm

Zusammenfassung

Epithelien bilden das Deck- und Abschlussgewebe aller äußerer und innerer Oberflächen von mehrzelligen Organismen. Epithelzellen zeichnen sich durch ihren polaren Aufbau und ihre morphologisch und funktionell zu unterscheidende apikale und basolaterale Membrandomänen aus. Um dies zu gewährleisten, besitzen Epithelzellen eine spezifische Transportmaschinerie, die den gerichteten Proteintransport an die jeweilige Membrandomäne bewerkstelligt. Ein wichtiger Sortierrezeptor im apikalen Proteintransport ist das Lektin Galektin-3. Dieses lösliche, im Zytosol synthetisierte Protein wird in polaren MDCK-Zellen präferentiell über die apikale Membran sekretiert, ehe es mittels Endozytose ins endosomale System eintritt und dort als Sortierrezeptor für neu synthetisierte apikale Glykoproteine dienen kann. Während die Bindung von Galektin-3 an die Plasmamembran prinzipiell an beiden Membrandomänen erfolgen kann, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Clusterbildung sowie die Endozytose des Lektins interessanterweise nur an der apikalen Domäne beobachtet.

Mittels Massenspektrometrie wurden Integrine als Interaktionspartner von Galektin-3 an der apikalen Plasmamembran von MDCK-Zellen identifiziert. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Fragestellung, ob Galektin-3 auch zur apikalen Lokalisation von Integrinen in Epithelzellen beiträgt. Dies wurde anhand von β 1-Integrin, eines weit verbreiteten Vertreters dieser Familie, untersucht. Mit Hilfe biochemischer und fluoreszenzmikroskopischer Methoden wurde die Oberflächenverteilung von β 1-Integrin in Galektin-3 überexprimierenden und depletierten MDCK Zellen analysiert. In Galektin-3 überexprimierenden Zellen, sowie unter Einfluss von exogenem, rekombinaten Galektin-3 wurde eine verstärkte apikale Lokalisierung

lung des Integrins beobachtet. Demgegenüber hatten eine Depletion des Lektins wie auch die Inhibierung seiner Endozytose verminderte apikale Expressionslevel von $\beta 1$ -Integrin zur Folge. Mittels metabolischer Markierung und Transportstudien konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 die Sortierung von neu synthetisiertem $\beta 1$ -Integrin in den apikalen Transportweg vermittelt. So konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Rolle des Lektins Galektin-3 bei der Oberflächenverteilung eines weit verbreiteten Mitglieds der Integrin-Familie in polaren Epithelzellen aufgezeigt werden.

Summary

Epithelia line the outer and inner surfaces of multicellular organisms. Epithelial cells are characterized by their polar structure and their morphologically and functionally distinct apical and basolateral membrane domains. To establish and maintain their polarity, epithelial cells possess a specific transport machinery that ensures directional transport to the respective membrane domains. An important sorting receptor in apical protein transport is galectin-3. This soluble lectin is synthesized in the cytosol and secreted in polarized MDCK cells preferentially at the apical membrane. Here, it enters the endosomal compartment via endocytosis and assists in the sorting of newly synthesized apical glycoproteins. While binding of galectin-3 can occur at both plasma membrane domains, clustering and endocytosis of the lectin were observed exclusively at the apical domain.

Integrins were identified as interaction partners of galectin-3 at the apical plasma membrane of MDCK cells by mass spectrometry. This interesting observation raised the question whether galectin-3 is involved in the apical localization of integrins in epithelial cells. To test this, the surface distribution of the most widespread family member, $\beta 1$ -integrin was analysed in galectin-3 overexpressing and galectin-3 depleted MDCK cells by biochemical assays and fluorescence microscopy. In galectin-3 overexpressing cells as well as in the presence of exogenous, recombinant galectin-3 the apical localization of $\beta 1$ -integrin was enhanced. Conversely, depletion of the lectin decreased apical expression levels of $\beta 1$ -integrin. Moreover, inhibition of galectin-3 endocytosis had the same effect. Using metabolic labeling and

transport experiments it was shown, that galectin-3 mediates sorting of newly synthesized $\beta 1$ -integrin in the apical transport pathway. This study shows for the first time, that galectin-3 is able to modulate the surface distribution of the integrin family member $\beta 1$ -integrin in polarized epithelial cells.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Epithelzellen	1
1.2	Proteintransport	4
1.2.1	Glykosylierungen	5
1.2.2	Sortiersignale im polaren Proteintransport	9
1.2.3	Polare Transportwege	11
1.2.4	Endozytose	12
1.3	Galektine	13
1.3.1	Struktur, Eigenschaften und Funktionen von Galektin-3	15
1.3.2	Sekretion und Endozytose von Galektin-3	16
1.4	Integrine	17
1.4.1	Allgemeiner Aufbau und Struktur der Integrine	18
1.4.2	Regulierung der Integrin-Funktion	19
1.4.3	Integrin-Funktion	23
1.5	Fragestellung	26
2	Material und Methoden	28
2.1	Geräte und Software	28
2.2	Chemikalien und Reagenzien	31
2.3	Verbrauchsmaterialien	34
2.4	Immunologische Reagenzien	35
2.5	Lösungen, Medien und Puffer	38
2.6	Zellkultur	42
2.6.1	MDCK Typ II Zellen	42
2.6.2	Weitere verwendete MDCK-Zelllinien	42
2.6.3	Kultivierung und Passage von MDCK Zellen	43
2.6.4	Kryokonservierung von Kulturzellen	43

2.7	Zellbiologische Methoden	44
2.7.1	Inhibition der Caveolin-abhängigen Endozytose durch Filipin	44
2.7.2	Sekretionstest	45
2.7.3	Bindung und Endozytose rekombinanter Proteine in MDCK-Zellen	45
2.8	Allgemeine proteinbiochemische Methoden	46
2.8.1	Herstellung von Zelllysaten	46
2.8.2	Proteinbestimmung nach Lowry	47
2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.8.4	Coomassie-Färbung	48
2.8.5	Fixierung und Trocknung von SDS-Gelen	48
2.8.6	Westernblot	48
2.8.7	Massenspektrometrie	50
2.8.8	Immunpräzipitation	51
2.8.9	Oberflächenbiotinylierung	52
2.8.10	Metabolische Markierung und Radiographie	53
2.9	Spezielle proteinbiochemische Methoden	54
2.9.1	Herstellung von rekombinantem Galektin-3	54
2.9.2	Eisenbeladung von Transferrin	55
2.9.3	Markierung rekombinanter Proteine	56
2.9.4	Funktionstest von aufgereinigtem Galektin-3	56
2.9.5	Funktionstest von Holo-Transferrin	57
2.9.6	Isolierung Membran-gebundener und internalisierter rekombinanter biotinylierter Proteine	57
2.9.7	Untersuchung der Endozytose von Oberflächenproteinen mit reduzier- barem Biotin	58
2.9.8	Glykosidase-Behandlung von Oberflächenproteinen	59
2.9.9	Transportstudie von β 1-Integrin	59
2.10	Fluoreszenzmikroskopische Methoden	60
2.10.1	Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	60
2.10.2	Immunfluoreszenz	61
2.10.3	Immunhistochemie	61
2.10.4	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	62
2.11	Quantifizierungen und Statistik	63
2.11.1	Quantifizierung von Proteinbanden	63
2.11.2	Quantifizierung fluoreszenzmikroskopischer Versuche	64

2.11.3 Statistik	64
3 Ergebnisse	65
3.1 Polare Verteilung von Galektin-3 in Epithelzellen	65
3.1.1 Galektin-3 wird ins apikale Medium sekretiert	65
3.1.2 Galektin-3 bindet an die apikale Plasmamembran	66
3.2 Interaktionspartner von Galektin-3 an der apikalen Membran	70
3.2.1 Identifizierung von Integrinen als apikale Bindepartner für Galektin-3	70
3.2.2 Galektin-3 bindet Zucker- und pH-abhängig apikal exprimierte Integrine	72
3.3 Lokalisation von Integrinen	75
3.3.1 Eine Minderzahl der Integrine ist in MDCK-Zellen an der apikalen Membran lokalisiert	75
3.3.2 Galektin-3 kolokalisiert mit $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Membran von MDCK-Zellen	75
3.3.3 In den Nierentubuli der Maus ist $\beta 1$ -Integrin hauptsächlich an der ba- solateralen Membran lokalisiert	77
3.4 Glykosylierung von $\beta 1$ -Integrin	78
3.4.1 Apikal und basolateral lokalisierte $\beta 1$ -Integrine tragen <i>N</i> -Glykane vom komplexen Typ	79
3.4.2 Apikal exprimierte $\beta 1$ -Integrine sind α -(2,6)-sialyliert	80
3.4.3 Glykosylierungsdefekte führen zu einer Fehlsortierung von $\beta 1$ -Integrin	82
3.5 Modulation der $\beta 1$ -Integrin-Verteilung an der Plasmamembran durch Galektin-3	87
3.5.1 Erhöhte Galektin-3-Level steigern die $\beta 1$ -Integrin-Expression	87
3.5.2 Galektin-3 verstärkt die apikale Lokalisation von $\beta 1$ -Integrin	87
3.5.3 Die Galektin-3-Oligomerisierung ist notwendig für die apikale Sortie- rung von $\beta 1$ -Integrin	90
3.5.4 Inhibition der Galektin-3-Endozytose depletiert $\beta 1$ -Integrin von der apikalen Membran	94
3.5.5 Die Lokalisation von $\beta 1$ -Integrin ist in der Galektin-3 KO Mausniere nicht beeinträchtigt	98
3.6 Modulation des Transport von neu synthetisiertem $\beta 1$ -Integrin durch Galektin-3	100
3.7 Endozytose von Galektin-3 und $\beta 1$ -Integrin	104
3.7.1 Die Endozytose von Galektin-3 erfolgt über die apikale Domäne	104
3.7.2 Galektin 3 und $\beta 1$ -Integrin werden gemeinsam endozytiert	105
3.7.3 Die $\beta 1$ -Integrin-Endozytose ist nicht durch Laktose inhibierbar	105

4 Diskussion	110
4.1 Polare Verteilung von Galektin-3 und Interaktion mit β 1-Integrin in Epithelzellen	110
4.2 Glykosylierung von β 1-Integrin	114
4.3 Modulation der Integrin-Lokalisation durch Galektin-3	121
4.4 Zusammenfassung und Ausblick	129
Literaturverzeichnis	134
Literatur	134
A Anhang	x
A.1 Herleitungen und weitere Ergebnisse	x
A.1.1 Einordnung der im Experiment verwendeten Galektin-3-Konzentration	x
A.1.2 Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von Galektin-3 Co-Präzipitaten	xii
A.2 Kontrollen	xiii
A.2.1 Galektin-3 kann den PET-Filter überqueren	xiii
A.2.2 Funktionstest von aufgereinigtem Galektin-3	xiv
A.2.3 Funktionstest von Eisen-beladenem und Floureszenz-markierten Transferrin	xv
A.3 Daten die durch Betreuung von Studenten entstanden sind	xvii
A.3.1 Glykosylierung von Clusterin/gp80	xvii
A.3.2 Interaktion von Galektin-3 und Clusterin/gp80	xviii
A.3.3 Sekretion von Clusterin/gp80 in MDCK Δ Gal3-Zellen	xviii
Abkürzungsverzeichnis	xxiv
Abbildungsverzeichnis	xxiv
Tabellenverzeichnis	xxvi
Publikationen und Beiträge auf Konferenzen	xxvi
Verzeichnis der akademischen Lehrer	xxvii
Danksagung	xxix

1. Einführung

1.1. Epithelzellen

Das Epithel ist ein spezialisiertes Gewebe, das in höher entwickelten Lebewesen eine Grenzschicht zwischen dem Inneren des einzelnen Organismus und seiner Umwelt darstellt. Epithelien bedecken alle äußeren und inneren Oberflächen und sind daher in vielen Teilen des Körpers zu finden. Während alle Epithelien als wichtige Barriere dienen und den Organismus vor eindringenden Pathogenen schützen, führen die Epithelien in verschiedenen Körperteilen unterschiedliche, spezialisierte und für die Körperhomöostase unabdingbare Funktionen aus. So ist das Epithelgewebe im Darm für die Aufnahme von Nährstoffen aus der Nahrung verantwortlich, wohingegen das Nierenepithel der Ausscheidung von Gift- und Abfallstoffen sowie der Retention verwertbarer Substanzen dient.

Der Aufbau von Epithelien folgt drei Grundprinzipien: Epithelzellen sind eng benachbart und über Zelladhäsionsmoleküle miteinander verbunden. Die Basalmembran, eine azelluläre, Protein- und Polysaccharid-reiche Schicht, grenzt das Epithel zum darunterliegenden Gewebe ab. Außerdem besitzen die Zellen des Epithels sowohl eine funktionelle als auch eine morphologische Polarität. Bei der Plasmamembran dieser polaren Zellen werden drei Membrandomänen unterschieden. Die apikale Domäne stellt die freie Oberfläche des Epithels dar und ist der Außenwelt beziehungsweise dem Lumen zugewandt. Die laterale Membran steht in Kontakt zu benachbarten Zellen, die basale Domäne ist mit der Basalmembran verankert. Aufgrund ihrer ähnlichen Zusammensetzung werden die laterale und basale Membran meist (sowie in der vorliegenden Arbeit) als basolaterale Membrandomäne

zusammengefasst (Ross & Pawlina, 2007).

Die Abgrenzung der apikalen Domäne gegenüber der basolateralen Membran wird durch die *Zonula occludens*, welche aus zahlreichen, engen Kontaktverbindungen, den *tight junctions* besteht, vermittelt (siehe Abbildung 1.1). Diese Zell-Zell-Verbindungen umspannen die Zelle gürtelförmig, dichten die Zellzwischenräume ab und sind damit für die Barrierefunktion des Epithels verantwortlich. Sie verhindern die laterale Diffusion im äußeren Blatt der Plasmamembran zwischen der apikalen und basolateralen Domäne und verhindern damit eine Vermischung der jeweiligen Membrankomponenten (Ross & Pawlina, 2007).

Neben diesen verschließenden Verbindungen (*Zonula occludens*) sind in Epithelien außerdem verankernde Verbindungen zu finden, die dem Gewebe Stabilität verleihen (Abbildung 1.1). Dabei vermitteln Transmembranproteine den Kontakt zu Nachbarzellen und zum Zytoskelett. Bei diesen Kontaktverbindungen können die *Zonula adherens* und die *Macula adherens* unterschieden werden. Die *Zonula adherens* wird von *adherens junctions* gebildet, die ähnlich wie die *tight junctions* die Zelle gürtelförmig umspannen und mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verankert sind. Dagegen sind die *Macula adherens* oder Desmosomen punktförmige, mit Intermediärfilamenten verknüpfte Zell-Zell-Kontakte. Fokale Adhäsionen und Hemidesmosomen vermitteln den Kontakt zur Basalmembran. Auch hier stellen Transmembranproteine die Verbindung zwischen Komponenten der Extrazellulären Matrix (EZM) und dem Zytoskelett her. Die Verbindung zum Aktinnetzwerk der Zelle wird über Fokale Adhäsionen hergestellt, die eine wichtige Rolle bei der Zellmigration während der Wundheilung spielen. Hemidesmosomen verankern die Basalmembran mit Intermediärfilamenten und sind in Geweben zu finden, die hohen mechanischen Kräften ausgesetzt sind, wie zum Beispiel der Haut. *Gap junctions* bilden eine weitere Klasse von Zell-Zell-Verbindungen, die dem Stoff- und Informationsaustausch zwischen benachbarten Zellen im Epithel dienen (Ross & Pawlina, 2007).

Eine weitere Besonderheit weisen Epithelzellen bezüglich der Organisation ihres Zytoskeletts auf. Während in unpolaren Zellen die Mikrotubuli mit ihren Minusenden am Zentrosom (auch als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC) bezeichnet) assoziiert sind, ist die Mehrheit der Mikrotubuli in Epithelzellen nicht am Zentrosom verankert sondern

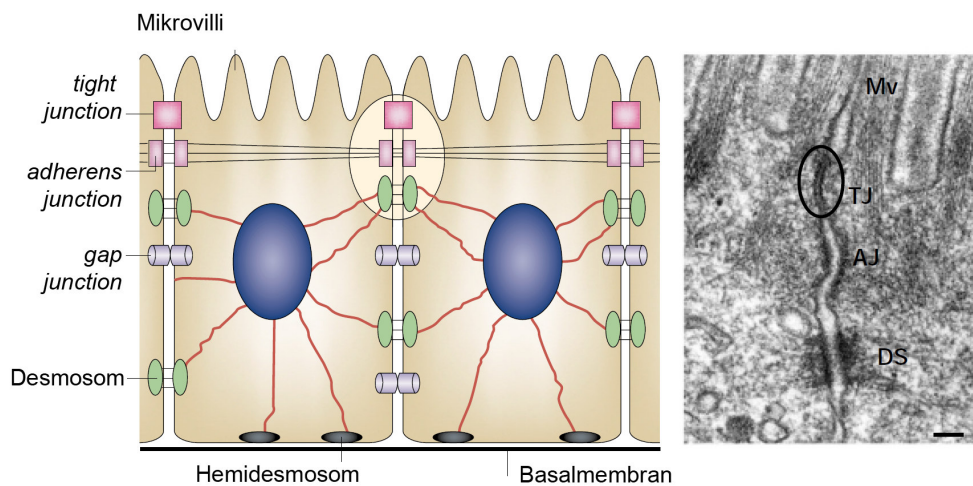


Abbildung 1.1.: Kontaktverbindungen in Epithelzellen. Links: Schematische Darstellung der Kontaktverbindungen in Epithelzellen. Zelladhäsionsverbindungen in der apikalen Region der lateralen Membran sind eingekreist. Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Darmepithelzellen der Maus. Eingekreist sind *tight junctions*. Mv = Mikrovilli, TJ = *tight junction*, AJ = *adherens junction*, DS = Desmosom. Maßstab 200 nm. Abbildung modifiziert, von Tsukita et al. (2001).

entlang der apiko-basolateralen Achse ausgerichtet, wobei die Minusenden zur apikalen und die Plusenden zur basolateralen Seite zeigen (Müsch, 2004). Daneben existiert eine kleinere Population von Mikrotubuli, die ihren Ursprung am MTOC haben und mit ihren Plusenden zur apikalen Domäne ausgerichtet sind (Jaulin et al., 2007). Aktinfilamente sind sowohl in unpolaren Zellen, als auch in Epithelzellen hauptsächlich am Zellkortex lokalisiert. In Epithelzellen ist außerdem unterhalb der apikalen Membran ein dichtes Aktinnetz zu finden, in welchem die Aktinfilamente der Mikrovilli verankert sind (Lodish et al., 2008).

Damit dieser komplexe Aufbau in Epithelzellen bewerkstelligt und aufrecht erhalten werden kann, ist ein gerichteter, polarer Proteintransport unerlässlich.

1.2. Proteintransport

Im Jahr 2013 wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin „für die Entdeckungen von Transportprozessen in Zellen“ an James Rothman, Randy Schekman und Thomas Südhof verliehen, denn der zielgerichtete Transport von neu synthetisierten Proteinen ist unabdingbar für die korrekte Funktionsweise der Zelle. Hierbei werden im Allgemeinen der zytoplasmatische Weg und der klassische sekretorische Weg unterschieden. Nach der Gentranskription im Nukleus wird die entsprechende *messenger* RNA (mRNA) ins Zytosol transportiert, wo die Proteinbiosynthese durch die Translation der mRNA an Ribosomen initiiert wird. Im zytoplasmatischen Weg findet die Translation an freien Ribosomen im Zytosol statt. Die so synthetisierten Proteine verbleiben im Zytosol, werden unkonventionell sekretiert oder können bei Vorhandensein einer entsprechenden Signalsequenz zum Zielkompartiment transportiert werden (Lodish et al., 2008). Dagegen werden Proteine die eine N-terminale Signalsequenz für das Endoplasmatische Retikulum (ER) besitzen über den klassischen sekretorischen Weg hergestellt und transportiert. Mit Hilfe des Signalerkennungspartikels (englisch *signal recognition particle*, SRP) wird diese Signalsequenz erkannt und die zu translatierende mRNA mitsamt dem Ribosom ans ER transportiert, wo die Proteinbiosynthese fortgesetzt wird und die Translokation der entstehenden Polypeptidkette direkt ins ER-Lumen erfolgt. Nach dem Transfer über oder in die ER-Membran erfolgt die Faltung, Oligomerisierung und Glykosylierung (siehe auch Abschnitt 1.2.1) der neu synthetisierten Proteine. Sie verlassen das ER an ER-Exitstellen und werden über *coat protein complex II* (COPII)-Vesikel weiter zum Golgi-Apparat transportiert. Beim Transit durch die Golgi-Zisternen zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die Glykanreste modifiziert. Vom TGN werden erneut Transportvesikel abgeknospt, welche mit Hilfe von Motorproteinen entlang des Zytoskeletts and die Ziellmembran transportiert werden. Die Erkennung der Ziellmembran erfolgt mit Hilfe von Rab-Proteinen, kleinen GTPasen, die an der zytoplasmatischen Seite über einen Prenylanker an der Vesikelmembran fixiert sind. Die Freisetzung der Cargoproteine erfolgt letztendlich durch Fusion mit der Ziellmembran, welche über SNARE-Proteine vermittelt wird (Lodish et al., 2008; Alberts et al., 2008; Mellman & Nelson, 2008).

1.2.1. Glykosylierungen

Die posttranslationale Proteinmodifikation ermöglicht das Anfügen zusätzlicher, nicht im Genom kodierter Informationen. Das Anfügen von Zuckerresten, die Glykosylierung, stellt hierbei aufgrund ihrer Komplexität eine Besonderheit dar. Neben der Abfolge der Monosaccharide können auch die Positionen der glykosidischen Bindung und des anomeren C-Atoms sowie die Ringgröße variieren. Da die Verknüpfung der einzelnen Zuckerreste an verschiedenen Stellen möglich ist, trägt auch die Verzweigung der Oligosachharide zur Komplexität des Zuckercodes bei (Gabijs et al., 2002).

In Eukaryonten findet die Glykosylierung von Proteinen im ER und Golgi co- und posttranslational statt. Anhand der Verknüpfung der Glykanreste werden N- und O-Glykosylierungen unterschieden. Die N-Glykosylierung beginnt zunächst im Zytosol mit dem Aufbau eines Kernoligosaccharides an Dolicholphosphat, welches mit der ER-Membran assoziiert ist (siehe Abbildung 1.2). Im Laufe der Synthese des Kernsaccharids wird dieses mit Hilfe einer Flippase ins ER-Lumen translokalisiert (Sanyal & Menon, 2009). Das komplette Kernoligosaccharid wird durch eine Oligosaccharyltransferase *en bloc* auf ein Asparagin in einem NXS/T-Motiv co-translational auf das wachsende Polypeptid übertragen. Im Folgenden kann das Zuckerbäumchen weiter modifiziert und getrimmt werden. Dabei bleiben jedoch fünf Zuckerreste in allen N-verknüpften Glykoproteinen unverändert. Diese bilden die Kernregion (siehe Abbildung 1.2, Lodish et al., 2008).

In Abbildung 1.3 ist die N-Glykanprozessierung vereinfacht dargestellt. Im ER werden zunächst die zwei terminalen Glukosereste durch die Glukosidasen I und II abgespalten. Monoglukosylierte Glykoproteine werden mit Hilfe der ER-lokalisierten Lektine Calnexin und Calretikulin gefaltet. Danach entfernt Glukosidase II die verbleibende Glukose und Mannosidase einen Mannoserest. Das Protein kann bei korrekter Faltung das ER verlassen und zum Golgi transportiert werden. Dort spaltet eine Mannosidase drei weitere Mannosereste ab. Einige Proteine bleiben in dieser Mannose-reichen (*high mannose*) Form und unterlaufen keiner weiteren Prozessierung (Stanley, 2011). Alternativ können GlcNAc-Reste an den Trimannosylkern angefügt werden, die meist mit Galaktose verlängert und einer Sialinsäure

abgeschlossen werden. Diese Zuckerketten werden als Antennen bezeichnet und sind charakteristisch für komplexe Oligosachharide. Der Grad der Verzweigung wird dabei durch die Anzahl der am Trimannosylkern angefügten GlcNAc-Einheiten bestimmt. Die Addition dieser Zuckerreste wird durch sogenannte *branching*-Enzyme, die GlcNAc Transferasen, oder Mgats (Mannosyl-Glykoprotein-*N*-Acetylglucosaminyltransferasen) vermittelt (Freeze, 2001; Lowe & Marth, 2003; Lodish et al., 2008).

Die meisten *O*-Glykosylierungen finden post-translational im Golgi-Apparat statt. Hier werden Sauerstoffatome von Serin oder Threonin mit Zuckerresten modifiziert. Dabei ist die Extension durch GalNAc (*O*-GalNAc) am weitesten verbreitet. Da diese Form der Glykosylierung ursprünglich auf Mucinen und in Mucin-ähnlichen Proteindomänen beobachtet wurde, wird diese Form der Glykosylierung auch als *O*-Glykosylierung vom Mucin-Typ bezeichnet (Jentoft, 1990). Später stellte sich heraus, dass sie viel weiter verbreitet ist und auch auf Proteinen ohne Mucin-Eigenschaften zu finden ist (Steentoft et al., 2013). In Abbildung 1.4 sind exemplarisch die Biosynthese der *O*-GalNAc-Vorläuferform sowie einige Elongationsmöglichkeiten dargestellt (Freeze, 2001; Lodish et al., 2008).

Neben Proteinen können auch Lipide mit Glykanresten modifiziert werden. Dabei sind Glykosphingolipide (GSLs) die am häufigsten vertretenen Glykoproteine in Säugetierzellen. GSLs sind durch eine Ceramid-Einheit charakterisiert, welche die extrazelluläre Glykankomponente in der Membran verankert. Die Kernstruktur der meisten GSLs besteht aus Glukosylceramid, welches im Zytosol von der Glykosylceramid-Synthase gebildet wird. Nach Translokation ins Golgi-Lumen kann die Kernstruktur durch eine Reihe von Glykosyltransferasen elongiert werden. Galaktosylceramid wird dagegen im Lumen des ER synthetisiert und kann im Golgi sulfatiert werden. Entsprechend ihrer Orientierung bei der Biosynthese sind GSLs fast ausschließlich im äußeren Blatt der Plasmamembran zu finden. (Lowe & Marth, 2003; Akimoto et al., 2009; Stanley, 2011)

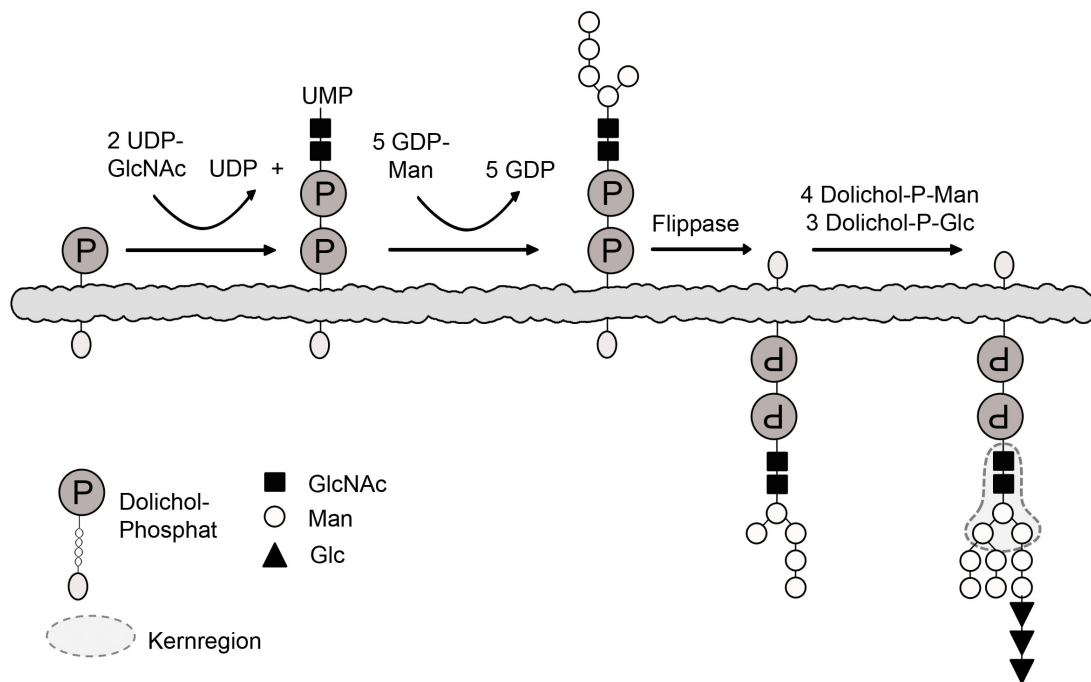


Abbildung 1.2.: Synthese des Kernoligosaccharids. Zwei UDP-GlcNAc und 5 GDP-Man-Einheiten werden mit Hilfe entsprechender Glykosyltransferasen auf Dolicholphosphat übertragen. Eine Flippase katalysiert die Translokation des Vorläufers in das ER-Lumen. Weitere Dolicholphosphat-Derivate (4 Dolicholphosphat-Man und 3 Dolicholphosphat-Glc) stellen Mannose- und Glukose-Einheiten zur Verfügung, die auf das Kernsaccharid übertragen werden. Das komplette Kernoligosaccharid besitzt 14 Zuckerreste. Dolichol-P = Dolicholphosphat, Glc = Glukose, GlcNAc = *N*-Acetylglucosamin, Man = Mannose.

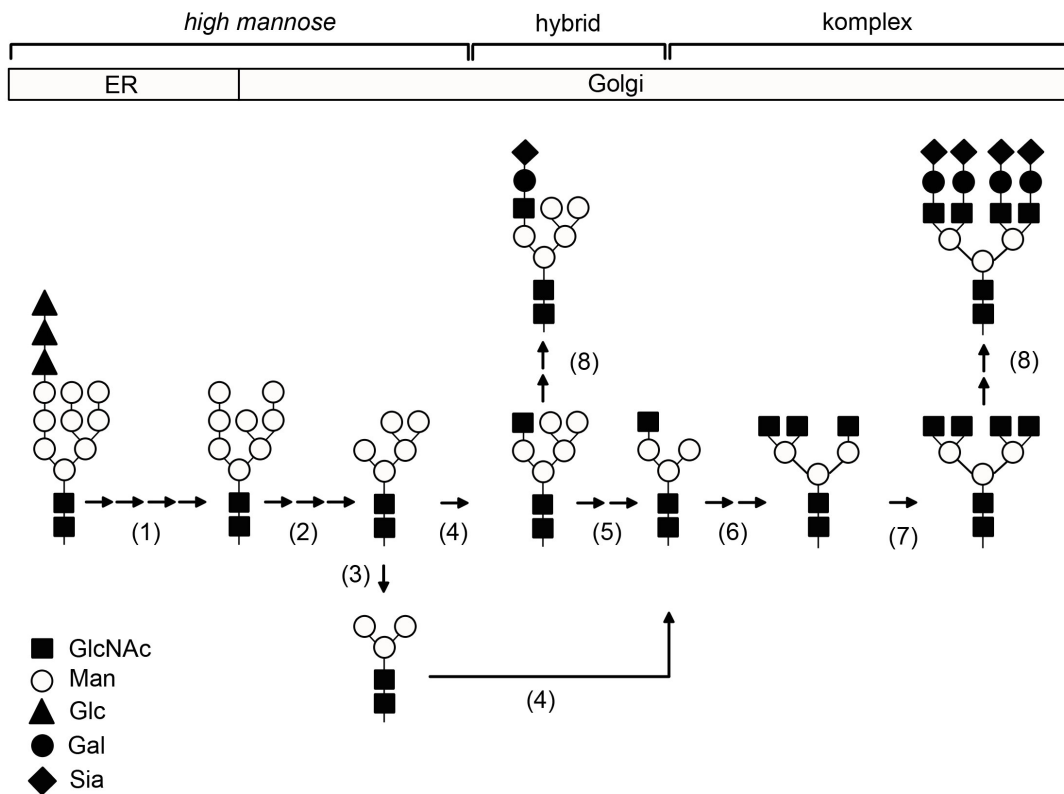


Abbildung 1.3.: N-Glykanprozessierung. (1) Im ER wird die erste terminale Glukose durch Glukosidase I, die beiden folgenden durch Glukosidase II und eine Mannose durch Mannosidase I entfernt. (2) Im Golgi spaltet Mannosidase I drei Mannoseresste ab. (3) Durch Mannosidase III können zwei weitere Reste abspalten werden. (4) GlcNAc Transferase I fügt einen GlcNAc-Rest an. (5) Mannosidase II entfernt zwei weitere Mannoseeinheiten. (6) Die Addition einer zweiten GlcNAc-Einheit durch die GlcNAc Transferase II initiiert die Ausbildung einer biantennären Zuckerkette. Durch das Anfügen eines dritten GlcNAc-Restes von GlcNAc Transferase IV wird die Ausbildung einer triantennären Kette initiiert. (7) Die GlcNAc Transferase V (auch als Mgat5 bezeichnet) kann eine vierte GlcNAc-Einheit anfügen und führt damit zur Ausbildung tetraantennärer Zuckerketten. (8) GlcNAc-Reste von komplexen und hybriden Zuckerketten werden mit Galaktose und Sialinsäuren erweitert. ER = Endoplasmatisches Retikulum, Gal = Galaktose, Glc = Glukose, GlcNAc = N-Acetylglucosamin, Man = Mannose, Sia = Sialinsäure.

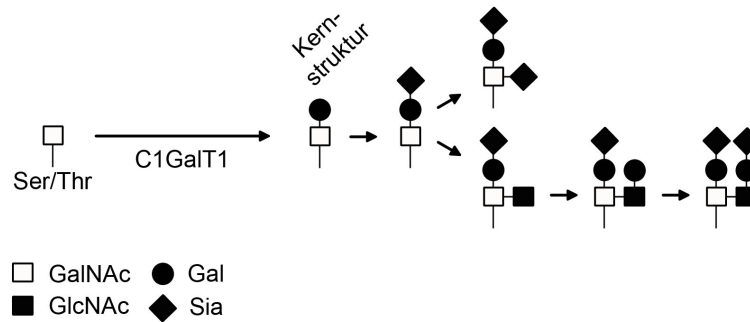


Abbildung 1.4.: Mucin-Typ O-Glykosylierung. Nach der Addition von GalNAc an Serin oder Threonin fügt die C1GalT1 (core1 β1,3-Galaktosyltransferase) eine Galaktoseeinheit an und bildet so die Kernstruktur. Diese wird durch eine Sialinsäure erweitert und kann als Vorläufer für weitere Zuckermodifikationen dienen. Ser = Serin, Thr = Threonin, Gal = Galaktose, GalNAc = N-Acetylgalactosamin, Glc = Glukose, GlcNAc = N-Acetylglucosamin, Sia = Sialinsäure.

1.2.2. Sortiersignale im polaren Proteintransport

Transportprozesse müssen in polaren Zellen, wie den hier untersuchten Epithelzellen, gerichtet stattfinden. Apikal und basolateral lokalisierte Proteine enthalten Sortiersignale in Form von Proteinmodifikationen oder topogenen Signalen. Diese können durch verschiedene Komponenten erkannt werden und stellen so den Transport an die entsprechende Membrandomäne sicher.

Apikale Sortiersignale sind divers und können in der exoplasmatischen, der Transmembran- oder der zytosolischen Domäne lokalisiert sein. Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker stellen das erste beschriebene apikale Sortiersignal dar (Lisanti et al., 1988). Sie können während der posttranslationalen Modifikation im ER an den C-Terminus von Proteinen mit hydrophober zytoplasmatischer Domäne angefügt werden (Mayor & Riezman, 2004). GPI-verankerte Proteine sind mit spezialisierten Membranmikrodomänen, sogenannten *lipid rafts* assoziiert. Diese Sphingolipid- und Cholesterin-reichen Membranbereiche entstehen bereits im TGN und sind an der apikalen, aber nicht an der basolateralen Membran zu finden (van Meer et al., 1987; van Meer & Simons, 1988). Als weiteres apikales Sortiersignal können N- und O-Glykosylierungen dienen. Urban et al. (1987) konnten beispielsweise zeigen, dass eine Inhibierung der N-Glykosylierung mit Tunicamycin zur Fehlsortierung von

Clusterin/gp80 in MDCK-Zellen führt. Für die korrekte apikale Sortierung des Neurotrophinrezeptors p75^{NTR} ist die O-Glykanmodifikation der Stabregion des Proteins notwendig (Yeaman et al., 1997). Desweiteren weisen manche Proteine apikale Sortiersignale in ihrer Aminosäuresequenz auf. Diese noch nicht vollständig charakterisierten Sequenzen wurden für die Influenza-Proteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase im Transmembranbereich lokalisiert (Kundu et al., 1996; Lin et al., 1998). Rhodopsin dagegen besitzt in der zytosplasmatischen Domäne eine Sequenz, welche für den apikalen Transport des Proteins in Photorezeptoren unabdingbar ist Chuang und Sung (1998).

Basolaterale Sortiesignale sind häufig in der zytosplasmatischen Proteindomäne lokalisiert und beinhalten oft hydrophobe Dileucin-Motive oder tyrosinbasierte Motive (meist YXXΦ, Y steht für Thyrosin, X für eine beliebige und Φ für eine große, hydrophobische Aminosäure, Carmosino et al., 2009). Sie können von Adaptorproteinen erkannt werden und durch die Rekrutierung von Clathrin zur Ausbildung von Vesikeln führen (Rodriguez-Boulan et al., 2005). Erste Hinweise auf basolaterale Sortiersignale stammen aus Arbeiten von Mostov et al. (1986) und Casanova et al. (1991), welche die Notwendigkeit der zytosplasmatischen Domäne des polymeren Immunglobulin-Rezeptors für dessen basolaterale Lokalisation demonstrierten und zeigten, dass dieses Sortiersignal auf andere Proteine übertragbar ist. Für einige Oberflächenproteine konnte gezeigt werden, dass basolaterale Signale gegenüber apikalen Sortiersignalen dominant sind. So wird der polymere Immunglobulin-Rezeptor zunächst an die basolaterale Domäne transportiert und anschließend mittels Transzytose an die apikale Membran befördert. Nach Deletion der zytosplasmatischen Signalsequenz erfolgte der Transport direkt an die apikale Membran (Mostov et al., 1986). Außerdem konnten die apikalen Proteine p75^{NTR} und Influenza HA nach Anfügen eines basolateralen Sortiersignals an der basolateralen Membran detektiert werden (le Bivice et al., 1991; Brewer & Roth, 1991). Allerdings scheint die Dominanz basolateraler Sortiersignale nicht immer gegeben zu sein. Jacob et al. (1999) demonstrierten, dass C-terminal angefügte Sortiersignale, welche zum basolateralen Transport von Influenza HA führen, keinen Effekt auf die Sortierung der Laktase-Phlorizin Hydrolase (LPH) haben.

1.2.3. Polare Transportwege

Lange Zeit galt das TGN als alleinige Sortierplattform für den apikalen und basolateralen Proteintransport. In Pionierarbeiten konnten Rodriguez-Boulan et al. (1984) und Rindler et al. (1984) in Virus-infizierte MDCK-Zellen zeigen, dass Influenza HA und *Vesicular stomatitis* Virus Glykoprotein G (VSV-G) von hier direkt an die apikale beziehungsweise basolaterale Plasmamembran transportiert werden. Unter „direktem Transport“ ist hier zu verstehen, dass die Proteine intrazellulär sortiert werden und anschließend ohne Umwege über die andere Membrandomäne an die jeweilige Plasmamembran gelangen. Dieser Transportweg konnte in späteren Arbeiten von Paladino et al. (2006) und Hua et al. (2006) bestätigt werden. Einige apikale Proteine werden jedoch zunächst an die basolaterale Membran transportiert, dort endozytiert und anschließend an die apikale Membran befördert. So gelangen neu synthetisierte *lipid raft*-assoziierte, GPI-verankerte Proteine nicht zur apikalen Membran, wenn die basolaterale Membran einem milden Fixierungsmittel ausgesetzt ist, während der Transport des *lipid raft*-unabhängigen p75^{NTR} davon nicht beeinflusst ist (Polishchuk et al., 2004). Auch der polymere Immunglobulin-Rezeptor wird in MDCK-Zellen über Transzytose an die apikale Membran sortiert (Mostov et al., 1986). Dabei durchquert er verschiedene endosomale Kompartimente wie das basolaterale frühe Endosom (BEE), das gemeine Recyclingendosom (CRE) und das apikale Recyclingendosom (ARE, Orzech et al., 2000; Brown et al., 2000). Die Passage durch Endosomen spielt auch für die Sortierung und den „direkten“ Transport einiger apikaler Membranproteine eine Rolle. Jacob und Naim (2001) beobachteten die Separation der apikalen Membranproteine LPH und Sucrase-Isomaltase (SI) in einem endosomalen Kompartiment, in welchem beide Proteine nach dem Verlassen des TGN lokalisiert sind. In diesem post-Golgi-Kompartiment findet die Sortierung in *lipid raft*-abhängige (im Fall von SI) und *lipid raft*-unabhängige (im Fall von LPH) Transportvesikel statt. Die Separation erfolgt dabei im *lipid raft*-unabhängigen Weg mit Hilfe von Galektin-3 durch Quervernetzung von Glykoproteinliganden (Delacour et al., 2006; Delacour, Greb et al., 2007). Auch für *lipid raft*-assoziierte apikale Proteine konnte die Beteiligung eines Lektins, Galektin-4, bei der Sortierung gezeigt werden (Stechly et al., 2009).

1.2.4. Endozytose

Die Endozytose ermöglicht der Zelle durch Membraneinstülpung und -abschnürung die Aufnahme von Substanzen aus dem Extrazellulärraum, sowie die Regulierung der Lipid- und Proteinzusammensetzung der Plasmamembran. Hierbei werden im Wesentlichen zwei Wege unterschieden: die Clathrin-vermittelte Endozytose und die Clathrin-unabhängige Endozytose (siehe Abbildung 1.5). Bei der Clathrin-abhängigen Endozytose wird Cargo mit Hilfe von Adaptorproteinen in Stachelsaumgrübchen (englisch *clathrin-coated pits*) rekrutiert. Die Polymerisation von Clathrin ermöglicht die Krümmung der Membran und die Ausbildung der Stachelsaumgrübchen. Die Abschnürung der sich so bildenden Vesikel von der Plasmamembran wird von der großen GTPase Dynamin vollzogen. In der Folge wird der Clathrinmantel unter Beteiligung von Auxilin und Hsc-70 entfernt, sodass das Vesikel mit intrazellulären Zielmembranen fusionieren kann (Doherty & McMahon, 2009). Daneben sind eine Reihe Clathrin-unabhängiger Mechanismen beschrieben worden. Allen gemeinsam und konträr zur Clathrin-vermittelten Endozytose ist die Assoziation von *lipid rafts*. Caveolae sind Membraninvaginationen die durch die Oligomerisierung von Caveolin-1 vermittelt werden. Bei der Abschnürung ist auch bei diesem Weg Dynamin beteiligt (Hansen & Nichols, 2009; Mayor et al., 2014). Auch Flotillin-Moleküle können durch Oligomerisierung Membraninvaginationen induzieren. Sie sind jedoch nicht in denselben Membranmikrodomänen wie Caveolin-1 lokalisiert und stellen daher einen Caveolae-unabhängigen Endozytoseweg dar (Doherty & McMahon, 2009). Desweiteren wurden Endozytosemechanismen identifiziert, die ohne Mantelproteine und ohne Abschnürungsmaschinerie auskommen. Hier induziert die Akkumulation bestimmter Lipide eine Deformation der Membran und folglich die Vesikelabschnürung (Mayor et al., 2014). Bei der Ausbildung solcher als *clathrin-independent carriers* (CLICs) bezeichneter Endozytosestrukturen können Lektine beteiligt sein. So bindet Galektin-3 GSLs an der Plasmamembran, erzeugt tubuläre Membraninvaginationen und integriert über Glykanbindungen Cargoproteinen in CLICs (Lakshminarayan et al., 2014).

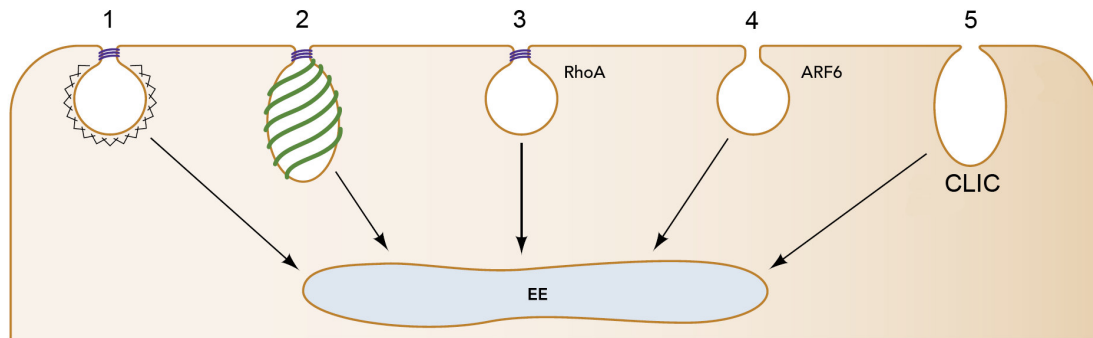


Abbildung 1.5.: Endozytosemechanismen. Neben der Clathrin- (und Dynamin-) abhängigen Endozytose (1) sind einige Clathrin-unabhängige Endozytosewege beschrieben (2-5), welche alle im frühen Endosom (EE) aufeinandertreffen. Ob alle dieser Clathrin-unabhängigen Endozytosemechanismen an beiden Membrandomänen ausgeführt werden ist nicht bekannt. 2) Caveolin- oder Flotillin und Dynamin-abhängige Endozytose. 3) Clathrin- und Caveolin-unabhängiger, Dynamin-abhängiger, RhoA-regulierter Endozytoseweg. 4) Clathrin- Caveolin- und Dynamin-unabhängige, ARF6-regulierte Endozytose. 5) Clathrin- Caveolin- und Dynamin-unabhängige Endozytose in *clathrin-independent carrier* (CLICs). Abbildung modifiziert von Welling und Weisz (2010).

1.3. Galektine

Als Lektine (lateinisch *legere*, lesen, auswählen) werden Zell-agglutinierende und Zuckerspezifische Proteine bezeichnet, die keine Enzymaktivität aufweisen und nicht immunologischen Ursprungs sind. Sie sind weit verbreitet in der Natur und kommen in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vor (Sharon & Lis, 1972; Gabius, 1997). Es wird allgemein angenommen, dass die erste Erwähnung dieser Proteinfamilie durch Peter Hermann Stillmark 1888 in dessen Dissertation erfolgte. Er isolierte Ricin aus den Samen des Wunderbaums (*Ricinus communis*) und beobachtete die Agglutination von Erythrozyten durch dieses Protein (Sharon & Lis, 2004). Lektine werden aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in ihrer Kohlenhydraterkennungsdomäne, (englisch *carbohydrate recognition domain*, CRD) und damit anhand ihrer Zuckerspezifität klassifiziert. Die Familie der Galektine sind durch ihre Affinität gegenüber β -Galaktosiden charakterisiert. Electrolectin ist das erste von Teichberg et al. (1975) entdeckte Mitglied dieser Familie, dessen Hämagglutinin-Aktivität durch β -Galaktoside inhibiert werden konnte. Diese Gruppe der Lektine wurde zunächst

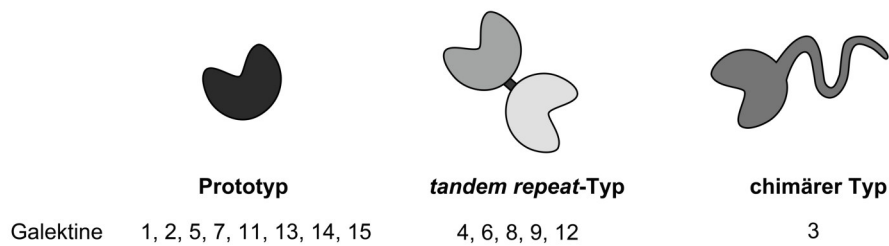


Abbildung 1.6.: Klassifizierung und Struktur der Galektine. Die Mitglieder der Galektinfamilie werden anhand der Anzahl und Struktur ihrer Kohlenhydraterkennungsdomänen (CRDs) eingeteilt. Galektine vom Prototyp besitzen eine CRD, solche vom *tandem repeat*-Typ weisen zwei, durch eine Linkersequenz verknüpfte CRDs auf. Chimäres Galektin-3 besteht aus einer CRD und einer flexiblen N-terminalen Domäne. Modifiziert von Hönig et al. (2015).

als S-Typ Lektine bezeichnet, da ihre Aktivität von der Anwesenheit freier Thiolgruppen abhängig zu sein schien. Allerdings stellte sich heraus, dass nicht alle Vertreter dieser Familie Cysteinreste aufweisen (Akimoto et al., 2009). Daher wurde sie im Jahr 1994 mit Zustimmung der Forschungsgemeinschaft in Galektine umbenannt (Barondes et al., 1994).

Galektine tauchten schon früh in der Metazoen-Evolution auf und weisen von *C. elegans* bis zum Menschen ähnliche Affinitäten für verschiedene Galaktoside auf (Boscher et al., 2011). Mitglieder der Familie wurden in Schwämmen, Pilzen, Nematoden, Insekten und Vertebraten gefunden. Homologe sind in Pflanzen vorhanden, aber nicht in Bakterien und Hefen (Dumic et al., 2006). Derzeit sind 15 Mitglieder der Galektin-Familie in Säugetierzellen bekannt. Sie werden anhand ihrer CRD in drei Klassen eingeteilt (siehe Abbildung 1.6, Hirabayashi & Kasai, 1993). Während Prototyp-Galektine nur eine CRD aufweisen, besitzen Galektine vom *tandem repeat*-Typ zwei homologe aber verschiedene CRDs, die über eine Linkersequenz verbunden sind. Vom chimären Typ ist derzeit nur ein Vertreter, Galektin-3, bekannt. Es besteht aus einer CRD und einer Prolin- und Glycin-reichen N-terminalen Domäne (Leffler et al., 2004).

1.3.1. Struktur, Eigenschaften und Funktionen von Galektin-3

Die Kristallstruktur der Galektin-3-CRD konnte erstmals von Seetharaman et al. (1998) aufgelöst werden. Dabei zeigte sich, dass die CRD von zwei β -Faltblättern gebildet wird, die eine β -Sandwichstruktur formen. Die Kohlenhydratbindetasche kann in die Bereiche A bis E unterteilt werden, wobei die Bindung von β -Galaktose über die Bindestelle C erfolgt (Leffler et al., 2004). Im Gegensatz zu der etwa 100fach höheren Affinität für Laktose ist die Interaktion der CRD mit dem Einfachzucker jedoch vergleichsweise schwach (Leffler & Barondes, 1986). Die Binderegion bietet in den Bereichen A, B, D und E Platz für weitere Zuckerreste, wodurch die Bindung komplexer Glykane ermöglicht wird. Diese Bindestellen sind jedoch weniger konserviert und tragen daher zu den verschiedenen Ligandenspezifitäten innerhalb der Galektinfamilie bei (Leffler et al., 2004).

Galektin-3 wurde zum ersten Mal als Oberflächenantigen auf Makrophagen entdeckt und wurde daher ursprünglich Mac-2 benannt (Ho & Springer, 1982). Die N-terminale Domäne von Galektin-3 besitzt Prolin-, Glycin- und Tyrosin-reiche repetitive Einheiten, deren Anzahl zwischen den Spezies variiert. So ist humanes Galektin-3 26.2 kDa groß, canines dagegen 30.3 kDa (Herrmann et al., 1993). Galektin-3 wird in vielen Geweben exprimiert und ist im adulten Organismus hauptsächlich in epithelialen und in Immunantwort-vermittelnden Zellen zu finden. Es ist an der Regulation vielfältiger zellulärer Prozesse beteiligt wie beispielsweise beim RNA-Splicing, dem Zellwachstum, der Differenzierung, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, dem gerichteten Proteintransport, der Apoptose, der Angiogenese und der Tumorgenese (Dumic et al., 2006). Entscheidend für die Art und Weise der Interaktion mit anderen Proteinen und die Funktion des Lektins ist seine zelluläre Lokalisation. Da im Zytosol nur geringe Mengen an Glykoliganden vorhanden sind, werden die Galektin-3-Funktionen hier meist Glykan-unabhängig und über Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Im Extrazellularraum, sowie im Lumen von Endosomen und Transportvesikeln und im klassischen sekretorischen Weg sind dagegen zahlreiche Glykoliganden präsent und die Funktionen des Lektins werden meist Zucker-abhängig ausgeübt (Akimoto et al., 2009).

Die Funktionen von Galektin-3 sind desweiteren meist von dessen Eigenschaft abhängig, komplexe Oligomere auszubilden. In der Literatur beschreiben zwei Modelle die Oligomerisierung des Lektins. Beiden Modellen gemeinsam ist, dass die Oligomerisierung erst nach Bindung eines (mindestens divalenten) Liganden induziert wird. Das erste, die sogenannte N-Typ-Oligomerisierung beschreibt die Selbstassoziation von Galektin-3 über die N-terminale Domäne zu Pentameren (Ahmad et al., 2004). Bei dem zweiten Modell, der C-Typ-Oligomerisierung interagieren die CRDs verschiedener Galektin-3-Moleküle miteinander, wodurch auch die Ausbildung höherer Oligomere (als Pentamere) erklärt werden kann. Es ist anzumerken, dass auch bei diesem Modell die N-terminale Domäne für eine effiziente Oligomerisierung wichtig ist. So ist die Mutante hGal3C-TRX, bei der die N-terminale Domäne deletiert ist, weiterhin in der Lage zu oligomerisieren, allerdings weitaus ineffizienter als das intakte Protein (Lepur, Salomonsson et al., 2012).

Bei der Ausbildung komplexer Galektin-3-Oligomere können gleichzeitig mehrere Glykoliganden vernetzt und so ein dynamisches Netzwerk (*galectin lattice*, „Galektin-3-Cluster“) gebildet werden. Dieses Netzwerk reguliert die Diffusion, Kompartimentierung und Endozytose von Glykolipiden und Glykoproteinen an der Plasmamembran und nimmt damit eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse ein (Nabi et al., 2015).

1.3.2. Sekretion und Endozytose von Galektin-3

Wie alle Mitglieder der Galektin-Familie, besitzt auch Galektin-3 keine klassische Signalsequenz und wird an freien Polysomen im Zytoplasma synthetisiert (Akimoto et al., 2009). Da Galektin-3 trotz Inhibition der klassischen Sekretion durch Monsenin und Brefeldin A sekretiert wird (Lindstedt et al., 1993), scheint Galektin-3 die Zelle über einen unkonventionellen Sekretionsmechanismus zu verlassen. Dies geschieht vermutlich über Exosomen, deren Biogenese in Multivesikulären Körperchen (MVK) stattfindet. Dabei werden in speziellen Endosomen durch Membraneinstülpungen intraendosomale Vesikel generiert, die lösliches Material aus dem Zytoplasma enthalten. Die an der Plasmamembran freigesetzten Vesikel werden dann als Exosomen bezeichnet (Nickel & Rabouille, 2009). Galektin-3 konnte als Bestandteil

solcher Exosomen identifiziert werden (Théry et al., 2001; Schneider, 2011). Die unkonventionelle Sekretion von Galektin-3 verhindert die Bindung des Lektins an Oligosachharide im Lumen von ER und Golgi, und eine möglicherweise daraus resultierende Aggregation von Glykoproteinen im klassischen sekretorischen Weg (Nickel & Rabouille, 2009).

Galektin-3 kann mittels Endozytose wieder in die Zelle gelangen. Hierfür wurden verschiedene Endozytosemechanismen beschrieben. In Makrophagen wurde neben einem Clathrin-unabhängigen Weg auch eine Rezeptor- und Clathrin-vermittelte Internalisierung des Lektins beobachtet, welche nicht durch Laktose inhibiert werden konnte (Lepur, Carlsson et al., 2012). Dagegen kann in MDCK-Zellen die Galektin-3-Endozytose durch Laktose vollständig inhibiert werden (Schneider et al., 2010). Hier wurde Galektin-3 an der apikalen Membran in Caveolin- oder Flotillin-positiven Strukturen detektiert (Straube et al., 2013). Desweiteren konnten Lakshminarayan et al. (2014) die Beteiligung von Galektin-3 bei der Ausbildung von CLICs zeigen (siehe auch Abschnitt 1.2.4). Endozytiertes Galektin-3 wird an der apikalen Membran von Epithelzellen recycelt und spielt eine wichtige Rolle bei der Sortierung von neu synthetisierten *lipid raft*-unabhängigen Glykoproteinen in den apikalen Transportweg (Straube et al., 2013).

1.4. Integrine

Bei der Familie der Integrine handelt es sich um 90 bis 160 kDa große Transmembranrezeptoren, die in allen Metazoen vertreten sind. In Prokaryonten, Pflanzen und Pilzen wurden keine Homologen gefunden (Whittaker & Hynes, 2002). Ihre Funktionen in der Zelle sind die Vermittlung der Zelladhäsion und die Signaltransduktion. Durch die Interaktion ihrer extrazellulären Domänen bilden sie aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit Heterodimere. In Säugern sind derzeit 18 Vertreter der α -Untereinheit und 8 der β -Untereinheit bekannt, die miteinander 24 verschiedene Heterodimere ausbilden können (M. Humphries, 2000).

1.4.1. Allgemeiner Aufbau und Struktur der Integrine

Die Auflösung der Kristallstruktur gelang erstmalig Xiong et al. (2001) für das extrazelluläre Segment des $\alpha v\beta 3$ -Heterodimer und war entscheidend für das Verständnis der Funktionsweise von Integrinen.

Abbildung 1.7 zeigt schematisch den Aufbau der beiden Untereinheiten. Die α -Untereinheit besteht aus einer langen *stalk*-Region und einer globulären Kopfregion. Die Kopfregion wird von einer β -Propeller-Domäne gebildet. In 9 der 18 bekannten α -Untereinheiten ist eine weitere, zwischengelagerte (englisch *inserted*) Domäne, die I-Domäne zu finden. Aufgrund ihrer Homologie zur von Willebrand Fraktor A-Domäne, wird diese mitunter auch als A-Domäne bezeichnet. Auch die β -Untereinheit besteht aus einer *stalk*- und einer Kopfregion. In der *stalk*-Region befinden sich vier Cystein-reiche repetitive Elemente. Die Kopfregion besitzt neben einer Hybrid- und einer Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI)-Domäne eine I-ähnliche (englisch *I-like*) Domäne, die sogenannte β I-Domäne. Die zytosolischen Domänen beider Untereinheiten sind mit 40-70 Aminosäuren recht klein. Eine Ausnahme bildet hier die C-terminale Domäne des $\beta 4$ -Integrins. Sie ist mit einer Länge von etwa 1000 Aminosäuren eine der größten bekannten zytosolischen Domänen überhaupt (Hynes, 2002; M. Humphries et al., 2003).

Neu synthetisierte α - und β -Untereinheiten dimerisieren bereits im ER. Die Dimerisierung erfolgt über die β -Propellerdomäne oder, soweit vorhanden, die I-Domäne der α -Untereinheit und die β I-Domäne der β -Untereinheit (siehe Abbildung 1.8). Die Aminosäuresequenzen der interagierenden Oberflächen bestimmen dabei die Kombination der α - und β -Untereinheiten (Bouvard et al., 2013).

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheiten der Integrine sind glykosyliert. Interessanterweise werden in Zellen unterschiedliche $\beta 1$ -Integrin-Glykovarianten exprimiert, wenn sie ihren Phänotyp verändern. $\beta 1$ -Integrine tragen multiantennäre poly-LacNAc-Extensionen, die von einer Sialinsäure terminiert sein können. Varianten der $\beta 1$ -Integrin-Glykosylierung resultieren aus einer veränderten Häufigkeit von Sialinsäuren oder von einer vermehrten Mgat5-vermittelten Verzweigung der N-Glykane (Bellis, 2004). Diese Veränderun-

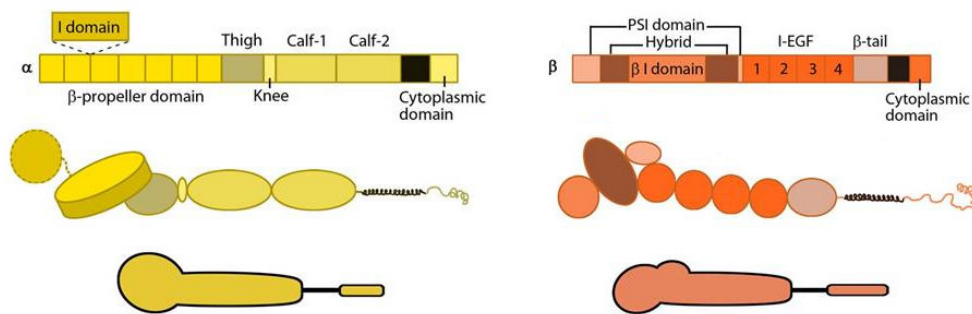


Abbildung 1.7.: Schematische Darstellung der Integrin-Untereinheiten. Links: Struktur der α -Untereinheit, rechts: Struktur der β -Untereinheit. Dargestellt sind die lineare Anordnung der Domänen (oben), die globuläre Struktur, die durch die Domänen ausgebildet werden (mitte) und eine vereinfachte Darstellung der Untereinheit (unten). Beachte: die I-Domäne ist nicht bei allen Vertretern der α -Untereinheit vorhanden. Verwendung der Bilder mit freundlicher Genehmigung von MBInfo: www.mechanobio.info; *Mechanobiology Institute, National University of Singapore*.

gen im Glykosylierungsmuster gehen häufig mit phänotypischen Transformationen in Karzinomen einher. In humanen Colon- und Adenokarzinomen sind die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheiten stärker $\alpha 2,6$ -sialyliert. Dadurch sind sie vor Induktion der Apoptose durch Galektin-3 geschützt, sind weniger adhären und erlangen einen invasiven Phänotyp (Zhuo et al., 2008; Yuan et al., 2016).

1.4.2. Regulierung der Integrin-Funktion

Die meisten Integrine sind nicht konstitutiv aktiv, sondern liegen als inaktive Heterodimere in der Plasmamembran vor, wobei sie weder Liganden binden, noch Signaltransduktion ausführen (Zhang & Chen, 2012). Die Regulierung der Integrin-Funktion ist komplex und erfolgt auf mehreren Ebenen über divalente Kationen, Liganden-Bindung, Bindung intrazellulärer Adaptorproteine und durch Integrin-Recycling (Franceschi et al., 2015).

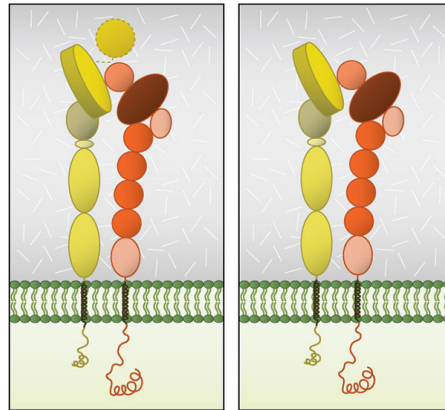


Abbildung 1.8.: Heterodimerisierung der Integrine. Die beiden Untereinheiten interagieren über die β I-Domäne der β -Untereinheit und die α I-Domäne (links) oder die β -Propellerdomäne (rechts) der α -Untereinheit. Verwendung der Bilder mit freundlicher Genehmigung von MBInfo: www.mechanobio.info; *Mechanobiology Institute, National University of Singapore*.

Integrin-Konformationen Integrin-Heterodimere können in drei Konformations- und Aktivierungszuständen vorliegen, welche in Abbildung 1.9 dargestellt sind. Inaktive Integrin-Heterodimere liegen in einer geschlossenen und kompakten Konformation vor, bei der die beiden Untereinheiten gebeugt sind. Die Affinität zu Liganden ist in dieser Konformation gering. Auch in der aufgerichteten Intermediärkonformation ist die Ligandenaffinität gering, sie ist erst in der aktiven Form erhöht. Hier verändern die zytosolischen und Transmembran-Domänen der α - und β -Untereinheiten ihre relative Position zueinander, wodurch die Ligandenbindestelle der extrazellulären Domäne freigelegt wird (Zhang & Chen, 2012; Franceschi et al., 2015).

Kationen Der Aktivierungszustand der Integrine kann unter anderem durch zweiwertige Kationen reguliert werden. Dabei hat Calcium (Ca^{2+}) einen inhibierenden Effekt, während Magnesium (Mg^{2+}) und Mangan (Mn^{2+}) die Ligandenbindung der meisten Integrine fördern. Zur Koordination dieser zweiwertigen Kationen weisen sowohl die α - als auch die β -Untereinheit verschiedene Metallionen-Bindungsstellen auf (Zhang & Chen, 2012). Tiwari et al. (2011) konnten zeigen, dass neu synthetisiertes β 1-Integrin in der inaktiven, gebeugten

Form vorliegt und die Faltung und die Assemblierung mit der α -Untereinheit im ER Ca^{2+} -abhängig sind. Desweiteren wird das Heterodimer während des intrazellulären Transport im klassischen sekretorischen Weg durch Ca^{2+} in der inaktiven Konformation gehalten und die Aktivierung an der Membran setzt den Austausch des Ca^{2+} durch Mg^{2+} oder Mn^{2+} voraus.

Extrazelluläre Liganden Die Aktivierung durch extrazelluläre Liganden vermittelt die *outside-in*-Signalübertragung der Integrine. Die Ligandenbindestelle wird von der β I-Domäne der β -Untereinheit und dem β -Propeller oder falls vorhanden der α I-Domäne der α -Untereinheit gebildet (Barczyk et al., 2010). Die Liste der Integrinliganden ist lang und beinhaltet die Hauptkomponenten der EZM. Die meisten Integrin-Rezeptoren sind in der Lage verschiedene Liganden zu binden. Umgekehrt können Proteine der EZM und Adhäsionsproteine der Zelloberfläche an verschiedene Heterodimere binden (J. Humphries et al., 2006). Die Kombinationen aus Integrinen und Liganden werden in vier Klassen eingeteilt, die in Abbildung 1.10 dargestellt sind. Das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD) stellt die minimale Erkennungssequenz in dem prototypischen Integrinliganden Fibronectin dar, und ist in vielen anderen EZM-Proteinen wie Vitronectin und Fibrinogen ebenfalls zu finden. Die Sequenz Leu-Asp-Val (LDV), ist unter anderem in einer alternativ gespleißten Form von Fibronectin vorhanden und kann von Integrinen erkannt werden, die ausschließlich von Leukozyten exprimiert werden. In fibrillärem Kollagen sind die RGD-Sequenzen normalerweise nicht zugänglich. Stattdessen erkennen Kollagen-bindende Integrine hier eine GFOGER-Sequenz. Drei β 1-Integrine (α 3 β 1, α 6 β 1 und α 7 β 1) und α 6 β 4 sind hochselektive Laminin-Rezeptoren, jedoch ist die Erkennungssequenz auf Laminin bisher nicht näher charakterisiert (J. Humphries et al., 2006; Barczyk et al., 2010; Campbell & Humphries, 2011).

Zytosolische Adaptorproteine Im Gegensatz zur Aktivierung durch extrazelluläre Liganden, vermittelt die Integrinaktivierung durch zytosolische Adaptorproteine die *inside-out*-Signaltransduktion. Der C-Terminus der β -Untereinheit enthält zwei NPXY-Motive, die von zytosolischen Proteinen mit PTB-Domäne erkannt werden können. Darüber können bei-

spielsweise Talin und Kindlin binden (Campbell & Humphries, 2011). Die Bindung von Talin an die zytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit ist ein gemeinsamer Schritt in der Aktivierung von $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Integrin (Tadokoro et al., 2003; Shattil et al., 2010). In Mäusen führt eine Talin-Depletion in Thrombozyten dazu, dass $\alpha \text{IIb} \beta 3$ -Integrin nicht aktiviert werden kann und schützt diese Mäuse vor Thrombose (Petrich et al., 2007). Neben der Aktivierung der Integrine, verbindet Talin diese mit filamentösem Aktin (F-Aktin) sowie Aktin-bindenden Proteinen und vermittelt so die Verknüpfung des Zytoskeletts mit der EZM (Shattil et al., 2010). Neben Talin scheint eine weitere Proteinfamilie, die Kindline (Kindline 1, 2 und 3 in Vertebraten), für die Aktivierung von Integrinen wichtig zu sein (Shattil et al., 2010). Beispielsweise führt die Depletion von Kindlin 1 in Mäusen zu einer intestinalen Dysfunktion und perinatalem Tod. Hier findet die Aktivierung von $\beta 1$ -Integrin nur eingeschränkt statt und führt aufgrund der verminderten Zelladhäsion zu einer Ablösung des Darmepithels (Ussar et al., 2008).

Oberflächenexpression Eine weitere Ebene der Regulation der Integrin-Funktion ist die Lokalisation an der Zelloberfläche. Dazu gehört der Transport von neu synthetisierten Integrinen über den klassischen sekretorischen Weg, die Internalisierung von der Plasmamembran sowie das Recycling endozytierter Integrine (Margadant et al., 2011). Martel et al. (2000) zeigten, dass neu synthetisierte Integrine in Talin-defizienten Zellen im ER akkumulieren. Die Autoren vermuten, dass die Bindung von Talin an $\beta 1$ -Integrin eine ER-Exportsequenz auf der α -Untereinheit freilegt und so den Transport durch den sekretorischen Weg gewährleistet. Die Integrin-Endozytose kann Clathrin-abhängig und -unabhängig erfolgen und ein gegebenes Integrin-Heterodimer kann über verschiedene Mechanismen internalisiert werden (Margadant et al., 2011). Bei der Clathrin-abhängigen Endozytose sind Adaptorproteine zur Rekrutierung von Clathrin notwendig (Ezratty et al., 2009; Chao & Kunz, 2009). Für die Adaptorproteine Numb und Dab-2 konnte gezeigt werden, dass sie an NPXY-Motive in der β -Untereinheit binden (Nishimura & Kaibuchi, 2007; Teckchandani et al., 2012). Lakshminarayan et al. (2014) zeigten, dass die Clathrin-unabhängige Endozytose über CLICs erfolgen kann und durch die Bindung von Galektin-3 an GSLs indu-

ziert wird. Hier konnte die Internalisierung von $\beta 1$ -Integrin durch einen *Knockdown* von Galektin-3 verringert, und bei einem gleichzeitigen *Knockdown* von Clathrin noch stärker inhibiert werden. Dagegen konnte in einer Studie von Furtak et al. (2001) die Endozytose von $\beta 1$ -Integrin vollständig durch Filipin, aber nicht durch Chlorpromazin inhibiert werden. Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass je nach Zelltyp und Heterodimer unterschiedliche Endozytosewege verwendet werden (Franceschi et al., 2015). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Internalisierung aktiver und inaktiver Integrine über verschiedene Mechanismen reguliert wird. So konnte in Endothelzellen gezeigt werden, dass Neuropilin-1 selektiv mit aktiven $\alpha 5 \beta 1$ -Heterodimeren assoziiert ist und deren Internalisierung reguliert. Der genaue Endozytoseweg wurde hierbei jedoch bislang nicht aufgedeckt (Valdembri et al., 2009). Internalisierte Integrine erfahren eines von zwei Schicksalen: die Degradation im Lysosom oder das Recycling zurück an die Plasmamembran (Margadant et al., 2011), wobei die Mehrheit der endozytierten Integrine recycelt wird (Bretscher, 1989, 1992). Es sind hierfür zwei verschiedene Recyclingwege beschrieben, die als *short loop*- beziehungsweise *long loop*-Recycling bezeichnet werden. Integrine, welche über den *short loop*-Weg recycelt werden, passieren ein Rab4-positives Endosom und gelangen vergleichsweise schnell zurück an die Plasmamembran. Dagegen werden Integrine im *long loop*-Recyclingweg über ein Rab11-positives perinukleäres Recyclingkompartiment recycelt (Bridgewater et al., 2012).

1.4.3. Integrin-Funktion

Integrine werden in allen Zelltypen außer den Erythrozyten exprimiert (Franceschi et al., 2015). Dabei wird die $\beta 1$ -Untereinheit ubiquitär exprimiert und kann mit mindestens 12 verschiedenen α -Untereinheiten assoziieren (Hynes, 2002).

Integrine sind Zelladhäsionsrezeptoren und gewährleisten durch Bindung von EZM-Proteinen wie zum Beispiel Fibronectin und Kollagen die Zelladhäsion. Dies wird durch die Integrin-vermittelte Verknüpfung der EZM zum intrazellulären Aktinzytoskelett erreicht. Dabei stellen Adaptorproteine wie Talin, Paxillin, α -Aktinin und Vinculin den Kontakt zum Aktinnetzwerk der Zelle her (Harburger & Calderwood, 2009). Auf diese Weise können me-

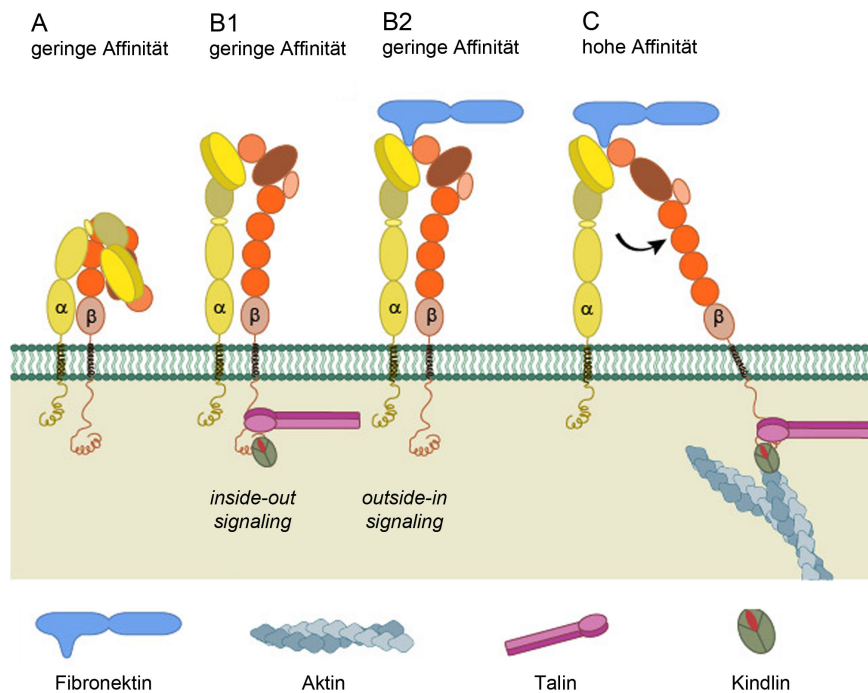


Abbildung 1.9.: Integrinaktivierung. **A)** Inaktives Integrin liegt in einer gebeugten Konformation vor. Die Affinität zu Liganden ist gering. **B)** *Inside-out*-Integrin Aktivierung durch zytosolische Proteine (**B1**) oder *outside-in*-Aktivierung durch extrazelluläre Liganden (**B2**) führen zur Aufrichtung des Heterodimers. **C)** Kennzeichen aktiver Integrine mit hoher Ligandenaffinität ist die räumliche Separation der zytoplasmatischen Domänen. Abbildung modifiziert, Verwendung des Bildes mit freundlicher Genehmigung von MBInfo: www.mechanobio.info; *Mechanobiology Institute, National University of Singapore*.

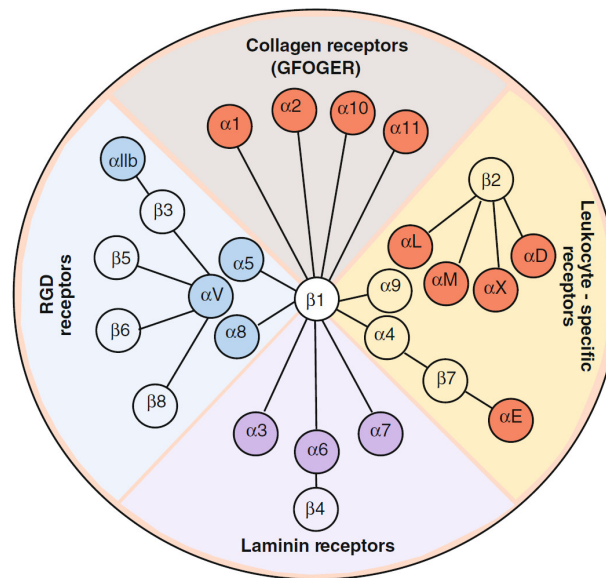


Abbildung 1.10.: Integrinliganden. Graphische Darstellung der Integrin-Liganden-Kombinationen. Integrin-Rezeptoren können eine Vielzahl von Liganden binden, umgekehrt können Liganden der extrazellulären Matrix verschiedene Integrin-Heterodimere binden. Abbildung von (Barczyk et al., 2010).

chanische Kräfte in beiden Richtungen über die Plasmamembran übertragen werden, was für zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Zellmigration essentiell ist (Evans & Calderwood, 2007). Neben der Verankerung der Zelle haben Integrine eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion. Sie vermitteln Informationen über die Lokalisation der Zelle sowie über die sie umgebende Matrix (Hynes, 2002; Miranti & Brugge, 2002). Solche Signale werden mit Hilfe von Signalproteinen wie der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) und der *Integrin-linked kinase* (ILK) vermittelt und veranlassen zelluläre Reaktionen wie die Differenzierung, Zellmigration, Proliferation und das Überleben der Zelle oder die Apoptose (Harburger & Calderwood, 2009). Zur Zellmigration und zum Beenden von Signaltransduktionen ist es notwendig, dass sich Integrine von ihren Liganden freimachen. Hierfür wird der Grad der Assoziation der Proteine im Adhäsionskomplex durch Konkurrenz, Phosphorylierung und Proteolyse verändert (Harburger & Calderwood, 2009). Beispielsweise führt eine kompetitive Bindung von ICAP-1 (*integrin cytoplasmic domain-associated protein 1*) an die β -Integrin-Untereinheit zur Verdrängung von Talin, wodurch die inaktive Konformation des Integrins

begünstigt wird (Millon-Frémillon et al., 2008). Die Proteolyse von Talin führt ebenso zu einer erhöhten *Turnover*-Rate von Fokalen Adhäsionen (Franco et al., 2004). Neben der Zelladhäsion zur EZM haben Integrine eine Reihe weiterer wichtiger Funktionen. Treten beispielsweise Thrombozyten in Kontakt mit beschädigten Blutgefäßen, wird $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin in der Plasmamembran der Thrombozyten aktiviert. Aktives $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin bindet Fibrinogen im Blutplasma mit hoher Affinität, wodurch Thrombozyten aggregieren und so durch Thrombusbildung zur Stillung von Blutungen beitragen können (Lodish et al., 2008). Desweiteren binden Integrine auch Zelladhäsionsmoleküle (englisch *cell adhesion molecules*, CAMs) auf anderen Zellen (Harburger & Calderwood, 2009). ICAM-1 wird von Endothelzellen exprimiert und dient als Ligand für den Integrin-Rezeptor LFA-1, der von Leukozyten exprimiert wird. Aktive Leukozyten binden über LFA-1/ICAM-1 an Endothelzellen und können so aus der Blutbahn in das umgebende Gewebe wandern (Rothlein et al., 1986; Long, 2011).

1.5. Fragestellung

Die Rolle von Galektin-3 als Sortierfaktor im apikalen Proteintransport ist durch Studien in MDCK-Zellen bereits gut verstanden. Um diese Funktion zu erfüllen, muss das Lektin zunächst durch Internalisierung in das endosomale System der Zelle gelangen. Ob dies in polaren Epithelzellen an beiden Membrandomänen stattfindet, oder ob sich hier wie bei der Sekretion von Galektin-3 eine Präferenz für die apikale Domäne zeigt, ist bisher nicht untersucht. Dies sollte durch Endozytose-Experimente mit Hilfe von rekombinantem Galektin-3 in polaren MDCK-Zellen analysiert werden. Desweiteren ist unbekannt, ob bei der Endozytose von Galektin-3 neben Glykosphingolipiden auch Glykoproteine beteiligt sind. Hierfür sollten zunächst proteinogene Interaktionspartner von Galektin-3 massenspektrometrisch identifiziert werden und anschließend mit Hilfe biochemischer und fluoreszenzmikroskopischer Methoden als Galektin-3-assoziierte Proteine verifiziert werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Integrine als Glykoliganden für Galektin-3 an der apikalen Plasmamembran in MDCK-Zellen identifiziert. Da Integrine vorwiegend basolater-

ral lokalisiert sind, sollte mit Hilfe von glykosylierungsdefizienten Zellen sowie Glykosidasen das Glykosylierungsmuster der apikalen und basolateralen Integrin-Populationen untersucht und untereinander verglichen werden. Die Funktion von apikal lokalisierten Integrinen in polaren Epithelzellen ist bislang wenig untersucht. Aufgrund der Rolle von Galektin-3 im polaren Proteintransport stellte sich die Frage, ob das Lektin an der Oberflächenexpression von Integrinen an der apikalen Membran beteiligt ist. Unter Verwendung Galektin-3 depletierter und Galektin-3 überexprimierender Zellen, sowie durch Experimente mit rekombinantem Galektin-3, sollte analysiert werden ob die Verteilung von Integrinen an der Plasmamembran von Galektin-3 abhängig ist. Ob Galektin-3 einen Einfluss auf die apikale Sortierung von neu synthetisierten Integrinen im klassischen sekretorischen Weg hat, sollte mit Hilfe metabolischer Markierung und Transportstudien unter An- und Abwesenheit von Galektin-3 untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Software

Inkubatoren

Zellkultur-Inkubator HeraCell 150i (CO₂-begast), Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Zellkultur-Inkubator Galaxy B (CO₂-begast), RS Biotech, Irvine (UK)

37 °C Inkubator, Heraeus, Hanau

Schüttel-Inkubator für Bakterienkultur Infors, Infors AG, Bottmingen (Schweiz)

Schüttelinkubator für Bakterienkultur innova 4300, New Brunswick Scientific, Edison (USA)

37 °C Inkubator für Bakterienkulturen, Memmert, Schwabach

Dampfgarer Multi Gourmet, Braun, Kronberg

Sterilbänke

Sterilbank für die Zellkultur HeraSafe, Thermo Scientific (Waltham, USA)

Sterilbank für die Bakterienkultur Faster BHA-48, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Zentrifugen

Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific (Waltham, USA)

Rotofix 32X, Hettich, (Tuttlingen, Deutschland)

Kühlzentrifuge Avanti J-20XP, Beckman-Coulter, Fullerton (USA)

Kühlzentrifuge Avanti J-26XP, Beckman-Coulter, Fullerton (USA)

Kühlzentrifuge Allegra X-22R, Beckman-Coulter, Fullerton (USA)

Rotoren

JLA 16.250, Beckman-Coulter, Fullerton (USA)

JLA-8100, Beckman-Coulter, Fullerton (USA)

SX 4250, Beckman-Coulter, Fullerton (USA)

Heizgeräte

Heizblock MB-102, Bioer, Hangzhou (China)

Vakuum-Geltrockner Model 583, Biorad (Hercules, USA)

Wasserbad für die Gewebeschnitte in der Histologie, GFL, Burgwedel

Schüttler

Magnetrührer Ikamag RH, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen

Kippschüttler Rocker25, Labnet International Inc., Edison (USA)

Überkopfschüttler REAX2, Heidolph, Kelheim

Elektrophorese- und Western Blot-Zubehör

Platten, „Spacer“, Kämme, Gießvorrichtung, Hoefer, San Francisco (USA)

Elektrophoresekammer Mighty Small II, Hoefer, San Francisco (USA)

Elektrophoresekammer miniVE, Hoefer, San Francisco (USA)

Netzgerät EPS 301 Amersham, Piscataway (USA)

Netzgerät EPS 501 Amersham, Piscataway (USA)

Transblot Semi-Dry Transfer Cell BioRad, Hercules (USA)

Mikroskope

Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM) TCS SP2 AOBS, montiert auf DM IRE2,
Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)

Inverses Lichtmikroskop Axiovert 10, Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)

Weitere optische Geräte

Chemostar Professional System von Intas, Göttingen

Multiplattenlesegerät infinite M200, 200 Pro, Tecan, Männedorf (Schweiz)

Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Radioluminografie-Scanner FLA-3000, Fujifilm, Minato (Japan)

Sonstige Geräte

Absaugsystem Vacusafe, Integra Bioscience, Biebertal

Analysewaage SBC 22, ScalTec Instrumentents, Göttingen

BAS Kasette 2025, Fujifilm, Minato (Japan)

CyberScan pH 510 Eutech Instruments, Nijkerk (Niederlande)

Membran-Vakuumpumpe Typ N86 KN.18, KNF Neuberger, Freiburg

Mikrotom Leica RM2125RT, Leica Wetzlar

Präzisionswaage SI-114 Denver Instruments, Göttingen

Reinstwassersystem Elix UV, Millipore, Billerica (USA)

storage phosphor screen, Amersham, Piscataway (USA)

Ultraschall-Homogenisator Labsonic U, B. Braun, Melsungen

Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York (USA)

Software

Adobe Photoshop CS2 und CS5, Adobe, San Jose (USA)

GraphPad Prism 5, GraphPad, La Jolla (USA)

Image J 1.46r, Wayne Rasband, NIH (USA)

JabRef 2.7.2, Morten O. Alver u.a.
 Lab Image 1D, Intas, Göttingen
 Leica Confocal Software 2.61, Leica Microsystems, Wetzlar
 Leica ASF Lite 2.6, Leica Microsystems, Wetzlar
 Office 2010 und 2013, Microsoft, Redmond (USA)
 TeXnicCenter Alpha 2.0, T. Weinkauff u.a.
 Volocity, Improvision, Lexington (USA)

Datenserver

NetNGlyc Version 1.0
 NetOGlyc Version 4.0
 UniProtKB

2.2. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Bezugsquelle
³⁵ S-Methionin	Hartmann Analytic (Braunschweig, Deutschland)
Acrylamidmix	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Alexa-NHS-Ester	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Antipain	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ampicillin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Antibody Diluent	Dako (Hamburg, Deutschland)
Aprotinin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ascrobat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Asialofetuin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Bacto-Agar	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Bacto Trypton	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bacto <i>yeast extract</i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Calciumchlorid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<i>cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i>	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
D _C Protein Assay Kit	Biorad (Hercules, USA)
Deferoxamin (DFO)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
DMSO	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DTT	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
ECL-Reagenz SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
EDTA	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Eisenchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Endo H	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (vergällt)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FAC (Eisenammoniumcitrat)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FKS	PAA Laboratories, (Pasching, Österreich)
Filipin III	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
G418	PAA Laboratories, (Pasching, Österreich)
Glutathion	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Guanidin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hoechst 33342	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
InstantBlue Protein Stain	Expedon (Cambridge, UK)
Iodacetamid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Leupeptin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
L-Glutamin	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Magermilchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Mercaptoethanol	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Mobicol Classic Säulen und Filter (<i>small</i> , 90 µm Porengröße)	MoBiTec (Göttingen, Deutschland)
Polylysin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Molekulargewichtsstandard PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (Glen Burnie, USA)
Natriumbutyrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdesoxycholat	MP Biomedicals, Eschwege
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Neuraminidase/O-Glycosidase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
NP40	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Pepstatin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
PFA	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
PNGase F	New England Biolabs, Ipswich (USA)
PMSF	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Polyysin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ponceau S	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SNA	Vectorlabs, Burlingame (USA)
Streptavidin-Peroxidase	KPL, (Gaithersburg, USA)

EZ Link Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Scientific (Waltham, USA)
EZ Link Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Scientific (Waltham, USA)
TEMED	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
apo-Transferrin, canin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Zellkulturmedien	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Ziegenerum	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

Tabelle 2.1.: Verwendete Chemikalien

Weitere, hier nicht aufgeführte allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden von Sigma, Roth, Riedel-de Häen, Fluka, Merck, Serva oder ICN bezogen und waren mindestens von p.a.-Qualität.

2.3. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Deckgläser (42 mm x 0.17 mm)	H. Saur, Reutlingen
Deckgläser (18 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Filter (Porengröße 0.45 µm)	Sarstedt, Nürnberg
Filterpapier Whatmann 3MM	Whatmann, Maidstone (UK)
Hamilton Mikroliterspritze (100 µL)	Hamilton-Bonaduz AG, Bonaduz (Schweiz)
Kulturschalen (10 cm, 3 cm, 6- und 24-Lochplatten) und PET-Filtereinsätze	Sarstedt, Nürnberg
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nürnberg

Laktosyl-beads	EY Laboratories Inc., San Mateo (USA)
NeutrAvidin Agarose-Resin	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Nitrocellulose-Membran Protran	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PD-10 Gelfiltrationssäule	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nürnberg
Skalpell	B. Braun, Melsungen
Spritzen, Kanülen	B. Braun, Melsungen
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg

Tabelle 2.2.: Verbrauchsmaterialien

2.4. Immunologische Reagenzien

In den Tabellen 2.3 und 2.4 auf Seite 37 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet.

Primärantikörper							
Antigen	Klon	Spezies	Hersteller	IF	IHC	WB	IP
α Tubulin	DM1A	Maus	Sigma		1:500		
α 2-Integrin	H-293	Kaninchen	Santa Cruz			1:100	
β 1-Integrin	18/CD29	Maus	BD Bioscience			1:200	
β 1-Integrin	GTX128839	Kaninchen	GeneTex	1:50	1:100		2 μ L/mL Lysat
gp80	C-18	Ziege	Santa Cruz			1:1000	
Galektin-3	9C4	Maus	Novocastra	1:100	1:200		
Galektin-3	H-160	Kaninchen	Santa Cruz			1:200	
Galektin-3	M3/38	Ratte	Santa Cruz				3 μ L/mL Lysat
Galektin-3		Maus	Novocastra		1:200		
IgG	Serum IgG	Mensch	Sigma				2 bis 3 μ L/mL Lysat
Villin	C-19	Ziege	Santa Cruz		1:100		

Tabelle 2.3.: Verwendete Primärantikörper. IF = Immunfluoreszenz, IHC = Immunhistochemie, WB = Westernblot, IP = Immunpräzipitation.

Sekundärantikörper

Antigen	Markierung	Spezies	Hersteller	IF	IHC	WB
anti Maus	HRP	Ziege	Biorad			1:2000
anti Kaninchen	HRP	Ziege	Biorad			1:2000
anti Ziege	HRP	Esel	Santa Cruz			1:2000
anti Maus	Alexa546	Ziege	Thermo Scientific	1:200		
anti Kaninchen	Alexa488	Ziege	Thermo Scientific	1:200	1:400	
anti Kaninchen	Alexa546	Ziege	Thermo Scientific		1:400	
anti Ziege	Alexa546	Huhn	Thermo Scientific		1:400	

Tabelle 2.4.: Verwendete Sekundärantikörper IF = Immunfluoreszenz, IHC = Immunhistochemie, WB = Westernblot.

2.5. Lösungen, Medien und Puffer

Kulturmedium für MDCK Wildtyp und Δ Gal3 Zellen

DMEM *high glucose* mit 10 % (v/v) FKS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 1 % (v/v) L-Glutamin

Kulturmedium für MDCK Gal3-YFP Zellen

DMEM *high glucose* mit 10 % (v/v) FKS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 1 % (v/v) L-Glutamin und 0,5 mg/mL G418

Methioninfreies Medium

MEM *essential* mit 1 % (v/v) 100x Penicillin/Streptomycin und 1 % (v/v) L-Glutamin

Transfektionsmedium

Opti-MEM

Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden von der Marke Gibco von Thermo Scientific (Waltham, USA) bezogen.

<u>PBS</u>	140 mM	NaCl	<u>PBS⁺⁺</u>	PBS mit
	2.5 mM	KCl		1 mM CaCl ₂
	6.5 mM	Na ₂ PO ₄		1 mM MgCl ₂
	1.5 mM	K ₂ HPO ₄		
	in ddH ₂ O, pH 7,35			

ME-PBS

PBS mit 2 mM EDTA und 4 mM Mercaptoethanol

<u>LB-Medium</u>	1 % (w/v)	Bacto Trypton
	0.5 % (w/v)	Bacto-yeast-extract
	1 % (w/v)	NaCl
	100 µg/mL	Ampicillin

Proteinase-Inhibitoren-Mix (PI)

Lösung 1	PMSF 3.4 mg/mL in DMSO	
Lösung 2	20 µL	Pepstatin 1 mg/mL in DMSO
	20 µL	Antipain 5 mg/mL in DMSO
	20 µL	Leupeptin 5 mg/mL in PBS
	20 µL	Aprotinin 1 mg/mL in PBS
	20 µL	Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor 50 mg/mL in PBS
	ad 20 mL PBS	

Vor Gebrauch wurden 25 µL Lösung 1 und 500 µL Lösung 2 gemischt.

Standard-Lysepuffer und Lysepuffer für die Massenspektrometrie (MS)

<u>Standard</u>	25 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	
	1 mM	EGTA	
	100 mM	NaCl	
	1 % (v/v)	Triton X-100	
	0.5 % (v/v)	NP40	pH 7,5
<u>für MS</u>	25 mM	Tris	
	50 mM	NaCl	
	0.5 % (w/v)	Na-Desoxycholat	
	0.5 % (v/v)	Triton X-100	pH 8,0

<u>3x Laemmli-Puffer</u>	6 % (w/v)	SDS	
	30 % (v/v)	Glycerin	
	0.02 % (w/v)	Bromphenolblau	
	150 mM	Tris-HCl pH 6,8	
	150 mM	DTT	
<u>Elektrophoresepuffer</u>	25 mM	Tris	
	190 mM	Glycin	
	0.1 % (w/v)	SDS	
<u>Transferpuffer</u>	48 mM	Tris	
	39 mM	Glycin	
	0.04 % (w/v)	SDS	
	20 % (v/v)	Methanol	
<u>Ponceau-Rot</u>	0.1 % (w/v)	Ponceau S	
	1 % (v/v)	Essigsäure	
<u>Fixierlösung</u>	25 % v/v)	Isopropanol	
	10 % (v/v)	Essigsäure	
<u>Waschpuffer für die Massenspektrometrie</u>			
<u>Waschpuffer I</u>	0.5 % (v/v)	Triton X-100	
	0.5 % (v/v)	Na-Desoxycholat	in PBS
<u>Waschpuffer II</u>	125 mM	Tris	
	500 mM	NaCl	
	10 mM	ETDA	
	0.5 % (v/v)	Triton X-100	pH 8,0

Oberflächenbiotinylierung

<u>Puffer I</u>	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Triton X-100
	(0.2 % (w/v)	BSA)

Puffer 1 wurde mit und ohne BSA verwendet.

<u>Puffer II</u>	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	0.5 % (v/v)	Triton X-100
	0.1 % (w/v)	SDS
	0.2 % (w/v)	BSA

<u>Puffer III</u>	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
	500 mM	NaCl
	0.5 % (v/v)	Triton X-100
	0.2 % (w/v)	BSA

<u>Puffer IV</u>	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
------------------	-------	-----------------

NHS-SS-Biotin-Reduktionspuffer

	90 mM	NaCl
	1 mM	MgCl ₂
	0.1 mM	CaCl ₂
	60 mM	NaOH
	10 % (w/v)	FKS

<u>Carnoy</u>	60 % (v/v)	Ethanol
	30 % (v/v)	Chloroform
	10 % (v/v)	Essigsäure

2.6. Zellkultur

Alle Arbeiten mit Säugerzellen wurden unter sterilen Bedingungen und unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die hierfür benötigten Materialien wurden vor Gebrauch mit Ethanol desinfiziert, autoklaviert oder sterilisiert.

2.6.1. MDCK Typ II Zellen

Madin Darby *canine kidney* (MDCK)-Zellen wurden 1958 von S. H. Madin und N. B. Darby aus der Niere eines Cockerspaniels isoliert, zu dieser Zeit aber nicht publiziert (Dukes et al., 2011). In den späten 1970er Jahren zeigten Cereijido et al. (1978) und Misfeldt et al. (1976), dass die Zelllinie in Kultur ein konfluentes, einschichtiges Epithel mit ausgeprägter *Zonula occludens* ausbildet. Fortan wurde diese Zelllinie zur Untersuchung der sekretorischen Transportmaschinerie herangezogen (Rodriguez-Boulan et al., 2005).

Bezugsquelle: European Collection of Cell Cultures, Health Protection Agency (Salisbury, England)

2.6.2. Weitere verwendete MDCK-Zelllinien

Neben den in dieser Arbeit als MDCK Wildtyp (WT) bezeichneten MDCK Typ II Zellen, wurden folgende weitere Zelllinien mit modulierter Galektin-3-Expression verwendet: Galektin-3 überexprimierende MDCK Gal3-YFP Zellen (Straube et al., 2013) und Galektin-3 depletierte MDCK Δ Gal3-Zellen (hergestellt von Ralf Jacob, unveröffentlicht). Desweiteren wurden MDCK RCA^f-Zellen verwendet, die aufgrund eines Defekts im UDP-Galaktose-Transporter im Golgi-Apparat kaum Galaktose in Glykoproteine und -lipide einbauen können (Brändli et al., 1988; le Bivic et al., 1993). MDCK RCA^f-Zellen wurden freundlicherweise von Andre le Bivic (Marseille, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

2.6.3. Kultivierung und Passage von MDCK Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden auf 10 cm Kulturschalen in entsprechendem Medium (siehe Abschnitt 2.5) bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Wachstumsverhalten und Morphologie der Zellen wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach zwei bis drei Tagen wurde das Kulturmedium erneuert. Bei Bedarf wurden zur Kultivierung der MDCK Typ II-Zellen Polyethylenterephthalat (PET)-Filter verwendet, um die Ausbildung der Zellpolarität zu erleichtern (siehe Abbildung 2.1). Diese Kultivierung ermöglicht außerdem eine unterschiedliche Behandlung der apikalen und basolateralen Membrandomänen. Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden wenn nicht anders vermerkt, in polaren, 5 bis 7 Tage kultivierten MDCK-Zellen durchgeführt. Für den Erhalt der Zellen in Kultur und zur Vorbereitung für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die Zellen kurz vor Erreichen der Konfluenz auf neue Kulturschalen passagiert und gegebenenfalls auf Deckgläschen oder Filtereinsätze ausgesät. Hierfür wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und in PBS bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellkontakte abbauten und die Zellen abrundeten. Anschließend erfolgte eine etwa zehnminütige Inkubation mit einer Lösung aus 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA bei 37 °C bis sich die Zellen vollständig von der Kulturschale ablösten. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellen wurden 5 min bei 100 g pelletiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und entsprechend der weiteren Verwendung in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:20 ausgesät.

2.6.4. Kryokonservierung von Kulturzellen

Zur langfristigen Lagerung können die Zellkulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Dazu wurden die Zellen einer etwa 80 % konfluenten 10 cm Kulturschale wie beim Passagieren trypsiniert und pelletiert. Die Zellen wurden in 1 mL Einfriermedium (Medium des entsprechenden Zelltyps mit 10 % FKS und 10 % DMSO) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst 1 bis 2 h bei –20 °C eingefroren, danach

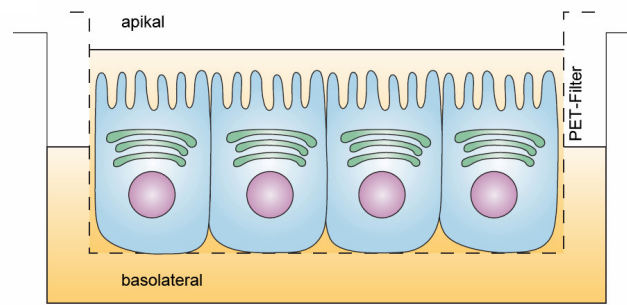


Abbildung 2.1.: Kultivierung von MDCK Typ II Zellen auf Filtereinsätzen. Die Kultivierung von MDCK Typ II Zellen auf PET-Filter erleichtert den Vorgang der Polarisation und ermöglicht eine selektive Behandlung der beiden Membrandomänen. Modifiziert von Rodriguez-Boulan et al. (2005)

etwa 18 h bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Um Zellen erneut zu kultivieren wurden diese dem Stickstofftank entnommen und mittels Handwärme aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit frischem Medium verdünnt und 5 min bei 100 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 mL des entsprechenden Kulturediums gelöst und auf eine 10 cm Kulturschale ausgebracht.

2.7. Zellbiologische Methoden

2.7.1. Inhibition der Caveolin-abhängigen Endozytose durch Filipin

Die Zelle besitzt diverse Endozytose-Mechanismen, die mit verschiedenen Substanzen inhibiert werden können. Filipin inhibiert die *lipid raft*-abhängige Endozytose die über Caveolae vermittelt wird (Orlandi & Fishman, 1998). Dazu wurden polare auf Filtereinsätzen kultivierte MDCK-Zellen über Nacht mit $3\mu\text{M}$ Filipin in Kulturmedium inkubiert (Filipin-Stocklösung: 3 mM Filipin in DMSO). Kontrollzellen wurden in der entsprechenden Menge DMSO kultiviert. Am nächsten Tag wurde vor der weiteren Verwendung der Zellen ihre Integrität lichtmikroskopisch überprüft.

2.7.2. Sekretionstest

Um die Sekretionsrate löslicher Proteine ins extrazelluläre Milieu und die Polarität dieses Vorgangs zu untersuchen wurden MDCK-Zellen 5 bis 7 Tage auf PET-Filter kultiviert. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in FKS-freiem Kulturmedium 4 h bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde die apikale Domäne mit 500 µL, die basolaterale mit 1 mL Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, mit 2 % (v/v) Proteinase-Inhibitoren-Mix (PI) versetzt und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die Zellen wurden auf Eis dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, mit 10 µL PI versetzt und in 500 µL Lysepuffer wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben lysiert. Es wurden 15 µL des apikalen und 30 µL des basolateralen Mediums, sowie 30 µL der Lysatprobe mit Lämmli-Puffer versetzt, per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert.

2.7.3. Bindung und Endozytose rekombinanter Proteine in MDCK-Zellen

Die Bindung und Endozytose von rekombinantem Galektin-3, Transferrin und *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA) wurde auf verschiedene Weise in MDCK-Zellen untersucht. Die Zellen wurden dazu, je nach weiterer Versuchsdurchführung 5 bis 7 Tage auf Deckgläschen, PET-Filtereinsätzen oder Zellkulturschalen kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen auf Eis transferiert und dreimal mit kaltem PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 0.3 bis 5 µM rekombinantem Protein in PBS⁺⁺ (wenn nicht anders vermerkt) für 30 min bei 4 °C. Nicht gebundenes Protein wurde danach durch dreimaliges Waschen mit PBS⁺⁺ entfernt. Gegebenenfalls wurden die Zellen anschließend bei 37 °C inkubiert, um die Endozytose zu induzieren. Überschüssiges, nicht internalisiertes rekombinantes Protein wurde durch Waschen mit 150 mM Laktose (im Fall von Galektin-3) oder 0.2 % Essigsäure (im Fall von Galektin-3 und Transferrin) entfernt. Dies geschah entweder 10 min nach Induktion der Endozytose, woraufhin die Inkubation bei 37 °C für verschiedene Zeiten fortgesetzt wur-

de oder nach Ablauf des gesamten Endozytose-Intervalls. Die Zellen wurden anschließend für die Fluoreszenzmikroskopie oder biochemische Versuche weiter verwendet. Die exakte experimentelle Durchführung der jeweiligen Versuche ist in dazugehörigen Bildunterschriften im Ergebnisteil vermerkt.

2.8. Allgemeine proteinbiochemische Methoden

2.8.1. Herstellung von Zelllysaten

Zur Ermittlung der Proteinexpression und im Verlauf einiger in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die zu untersuchenden Zellen lysiert. Die Zellen wurden hierfür auf Eis gestellt und dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die Zellen einer konfluenten 10 cm Kulturschale wurden mit 20 µL PI und 1 mL Lysepuffer versetzt, mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse erfolgte 30 min bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler. Um das Lysat von unlöslichem Zelldebris zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation bei 17 000 g und 4 °C für 15 min. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, direkt weiter verwendet oder bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.8.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde in dieser Arbeit die Methode nach Lowry et al. (1951) eingesetzt. Diese beruht auf zwei Reaktionen. In der ersten Reaktion bilden Kupfer (Cu^{2+})-Ionen mit Peptidbindungen in alkalischer Lösung einen blau-violetten Komplex aus (Biuretreaktion). Es folgt die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , welches wiederum Folin-Ciocalteu-Reagenz (gelb) zu Molybdänblau reduziert (Rehm & Letzel, 2010; Olson & Markwell, 2007). Zur Ermittlung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde der „D_C Protein Assay“ von Biorad verwendet. Dabei wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.8.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gel-Elektrophorese dient der Auftrennung und Analyse von Proteingemischen. Bevor die Proteine mit Hilfe eines Polyacrylamidgels aufgetrennt werden können, wird das Proteingemisch unter Anwesenheit des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) aufgekocht. Der verwendete Probenpuffer (Lämmli-Puffer, siehe unter 2.5) enthält außerdem das anionische Detergenz Natriumlaurylsulfat (englisch *sodium dodecyl sulfate*, SDS), welches zur Denaturierung dient und die Ausbildung von Quartärstrukturen unterbindet. Die SDS-Proteinkomplexe wandern im elektrischen Feld zur Kathode und können so anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden Polyacrylamidgele nach dem diskontinuierlichen Lämmli-System verwendet (Laemmli, 1970). Hier werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel mit hoher Porengröße fokussiert und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt. Durch Anpassung der Acrylamidkonzentration kann die Porengröße des Gels bestimmt werden. Für Proteine mit einem höheren Molekulargewicht eignen sich weitmaschige Gele mit niedriger Konzentration, dagegen werden kleine Proteine besser mit engmaschigeren Gelen höherer Acrylamidkonzentration aufgetrennt (Sambrook & Russell, 2001; Rehm & Letzel, 2010). Die in dieser Arbeit verwendeten 8 bis 12 % SDS-Gele wurden hergestellt wie in Sambrook und Russell (2001) beschrieben. Die Proteingemische wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und 5 bis 7 min bei 95 °C aufgekocht. Um die Größe der aufgetrennten Proteine einordnen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben der Molekulargewichtsstandard „Precision Plus Protein Prestained Standard (Dual Color)“ auf die Gele aufgetragen. Für die Fokussierung im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 bis 110 V angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 180 V erhöht bis die gewünschte Auftrennung erfolgt war. Die SDS-Gele wurden anschließend gefärbt, fixiert und getrocknet oder für das Westernblotverfahren verwendet.

2.8.4. Coomassie-Färbung

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde dazu die „InstantBlue Protein Stain“-Lösung von Expedeon verwendet. Das SDS-Gel wurde dafür nach der Elektrophorese für 1 h mit der Färbelösung inkubiert, anschließend mehrmals mit A.dest. gewaschen und dokumentiert.

2.8.5. Fixierung und Trocknung von SDS-Gelen

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zu fixieren, wurde das Gel für 45 min in Fixierlösung gelegt und anschließend dreimal mit A.dest. gewaschen. Das Gel wurde auf ein Whatman-Filterpapier überführt und dann über Nacht mit Hilfe des Vakuum-Geltrockners getrocknet.

2.8.6. Westernblot

Mit Hilfe des Blotverfahrens können die Proteine eines SDS-Gels auf eine Trägermembran zur weiteren Analyse übertragen werden. Die Methode wurde erstmals von Towbin et al. (1979) beschrieben und in Anlehnung an den Erfinder des Blotverfahrens für DNA, Edwin Southern, als Westernblot bezeichnet. In dieser Arbeit wurde das *semi dry* Verfahren wie in Sambrook und Russell (2001) beschrieben, angewandt. Filterpapiere, SDS-Gel und die Nitrocellulose-Trägermembran wurden in Transferpuffer (siehe 2.5) getränkt und wie in Abbildung 2.2 dargestellt geschichtet. Senkrecht zu diesem Aufbau wurde ein elektrisches Feld angelegt, um die negativ geladenen Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran zu transferieren und dort durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen zu immobilisieren. Für den Transfer wurde eine Spannung von 12 V für 55 min bis 1 h 15 min bei maximal 400 mA angelegt. Danach wurde die Membran mit Ponceau-Rot Färbelösung (siehe 2.5) gefärbt, um den erfolgten Transfer zu überprüfen. Anschließend wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch

Inkubation mit 5 % (w/v) Magermilchpulver/PBS für 1 h blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal gewaschen bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur erfolgte. Für den Nachweis der zu detektierenden Proteine ist an den Sekundärantikörper eine *horseradish*-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol unter der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Die bei dieser Reaktion stattfindende Lichtemission kann mit Hilfe von *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Lösungen verstärkt werden. Hier wurde für die Detektion das „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“-Kit von Thermo Scientific verwendet. Die ECL-Lösungen 1 und 2 wurden dafür zu gleichen Teilen gemischt, gegebenenfalls mit PBS verdünnt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Das entstehende Chemilumineszenzsignal wurde mit Hilfe des Chemostar Professional System von Intas detektiert. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 2.3 und 2.4 auf Seite 37 aufgelistet. Biotinylierte Proteine können mittels Streptavidin-gekoppelter Peroxidase direkt nachgewiesen werden. Streptavidin-Peroxidase wurde dazu 1:10 in PBS verdünnt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte wie oben geschildert.

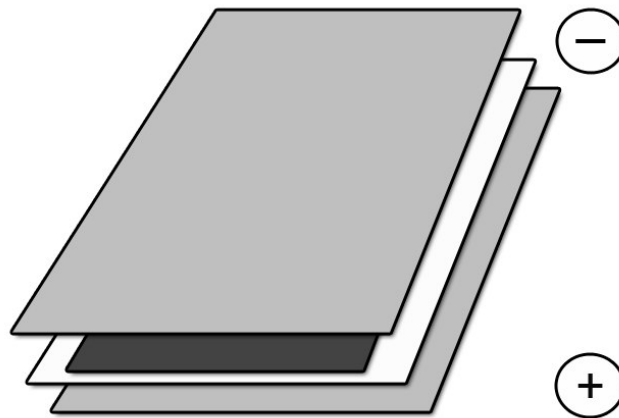


Abbildung 2.2.: Schematischer Aufbau beim Westernblot. Beim *semi dry* Blotverfahren werden das Polyacrylamidgel (dunkelgrau) und die Nitrozellulosemembran (weiß) von in Transferpuffer getränktem Filterpapier (hellgrau) eingefasst, um ein Austrocknen zu verhindern. Die negativ geladenen Proteine werden durch das angelegte elektrische Feld auf die Trägermembran übertragen.

2.8.7. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ermöglicht die genaue Bestimmung von Proteinmassen und ist damit eine geeignete Methode zur Identifizierung unbekannter Proteine. Dabei werden die in der Probe enthaltenen Proteine durch einen gepulsten Laser in die Gasphase überführt und ionisiert. Bei der hier eingesetzten *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight* (MALDI-TOF) Massenspektrometrie erfolgt die Verdampfung und Ionisierung mit Hilfe einer UV-absorbierende Matrix, in welche die Probe zunächst eingebettet wird. Nach Desorption aus der Probe werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und gelangen dann in ein feldfreies Flugrohr. Dort erreichen sie den Detektor je nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis nach unterschiedlichen Zeiten (Hesse et al., 2007; Berg et al., 2012). Für die vorliegende Arbeit wurden Präzipitate von an der apikalen Membran gebundenem Galektin-3 analysiert (2.7.3). Hier wurden 1.5 μ M hGal3-Biotin bei 4 °C an der apikalen Domäne konfluenter MDCK-Zellen inkubiert. Zelllysate wurden wie unter 2.8.1 beschrieben mit Lysepuffer für die Massenspektrometrie hergestellt und hGal3-Biotin sowie assoziierte Proteine mit Hilfe von Avidin-*beads* präzipitiert. Für die Präzipitation wurden pro Ansatz 30 μ L Neutravidin-*beads* eingesetzt, die über Nacht in Oberflächenbiotinylierungs-Puffer I mit 0.2 oder 10 % BSA inkubiert worden sind. Vor deren Einsatz zur Isolation wurden sie dreimal in selbigem Puffer gewaschen. Die Präzipitation erfolgte bei 4 °C für 1.5 h auf dem Überkopfschüttler. Anschließend wurden die *beads* je zweimal in Waschpuffer I und II gewaschen. Für die erste massenspektrometrische Analyse wurden die Avidin-*beads* durch Erhitzen in 30 μ L 2x Lämmli-puffer bei 95 °C für 7 min eluiert und die Proben über ein SDS-Gel aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung des Gels wurden prominente Banden ausgeschnitten und untersucht. Zur detaillierten Beschreibung des Waschens und Eluierens der *beads* mit Hilfe von Mobicol-Säulchen siehe auch Abschnitt 2.8.9. Bei der zweiten Durchführung wurden die Proben von den Avidin-*beads* durch Säure eluiert. Dies erfolgte durch eine zehnminütige Inkubation mit 25 mM Guanidin-HCl bei Raumtemperatur. Nach Abzentrifugation der Avidin-*beads* bei 2400 g für 5 min wurden die Überstände abgenommen und bis zur Analyse bei –20 °C gelagert. Hier wurden die Proben zunächst mittels Hochleistungsflüssigkeitschro-

matographie (englisch *high-performance liquid chromatography*, HPLC) gereinigt, bevor sie massenspektrometrisch untersucht wurden. Das Ausschneiden der Proteinbanden, die HPLC-Aufreinigung, die Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie sowie die Durchführung und Auswertung der MALDI-TOF Analysen wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Baumeister (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität-Marburg) durchgeführt.

2.8.8. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient der Isolierung bestimmter Proteine aus einem Zelllysate mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Bleiben Proteinkomplexe dabei intakt, können so auch die Bindungspartner eines Proteins isoliert werden (Co-Immunpräzipitation). Die Aufreinigung der Antikörper-Proteinkomplexe gelingt mit Hilfe von Protein G-beschichteten Sepharose (PGS)-*beads*, da Protein G eine hohe Bindeaffinität für den F_C-Teil von Immunglobulinen besitzt. Zunächst wurden aus polaren MDCK-Zellen wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, Lysate hergestellt. Daraus wurden 30 µL als Lysatprobe entnommen und mit 15 µL 3x Lämmli-Puffer versetzt. Die Lysate wurden anschließend mit über Nacht vorbereiteten *Preclearing-beads* versetzt und 1 h auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Dieser Schritt dient der Entfernung von Proteinen, die unspezifisch an die PGS-*beads* binden. Nach Abzentrifugation der *Preclearing-beads* bei 4 °C und 3500 g für 2 min wurden die eigentlichen IP-*beads* zum Überstand gegeben. Auch die IP-*beads* wurden über Nacht vorinkubiert. Die Präzipitation wurde für 1.5 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler durchgeführt. Anschließend wurden die IP- und *Preclearing*-Proben auf Mobicol-Säulchen überführt und jeweils zweimal mit 0.1 % NP-40/PBS und PBS gewaschen (Zentrifugation bei 4 °C und 3500 g für 30 sec). Die Mobicol-Säulen wurden mit einer Kappe verschlossen und zur Elution der Antikörper-Proteinkomplexe mit 30 µL 2x Lämmli-Puffer in einem Wasserbad bei 95 °C für 7 min erhitzt. Die Kappe wurde abgenommen und die isolierten Proteine durch Zentrifugation bei 17 000 g eluiert.

<i>Preclearing-beads:</i>	3 μ L IgG	+ 50 μ L PGS- <i>beads</i>	
<i>IP-beads:</i>	3 μ L anti Gal3 M3/38	+ 50 μ L PGS- <i>beads</i>	
	3 μ L IgG	+ 50 μ L PGS- <i>beads</i>	(Negativkontrolle)

2.8.9. Oberflächenbiotinylierung

Um Membranproteine gezielt von der apikalen oder basolateralen Domäne zu isolieren, können diese mit Hilfe von Biotin markiert und anschließend durch Avidin-*beads* isoliert werden. Zur Markierung der Oberflächenproteine wurde ein membran-impermeabler Biotin-*N*-Hydroxysulfosuccinimidyl (NHS)-Ester verwendet. NHS-aktiviertes Biotin reagiert mit primären Aminen und bildet stabile Peptidbindungen aus. Für die Oberflächenbiotinylierung wurden MDCK-Zellen auf PET-Filter in 6-Lochplatten bis zum Erreichen der Polarität kultiviert und gegebenenfalls vorher mit verschiedenen Substanzen behandelt. Die Zellen wurden zunächst dreimal mit kaltem PBS⁺⁺ gewaschen und von der apikalen oder basolateralen Seite mit 1.2 mg/mL NHS-Biotin/PBS⁺⁺ für 30 min bei 4 °C inkubiert. Auf die jeweils andere Seite wurde PBS⁺⁺ gegeben. Durch dreimaliges Waschen mit 0.1 M Glycin in PBS⁺⁺ wurde überschüssiges NHS-Biotin inaktiviert und durch zwei weitere Waschschrte mit PBS⁺⁺ entfernt. Nach diesem Schritt konnten die Kulturplatten gegebenenfalls vollständig abgesaugt, über Kopf bei –20 °C eingefroren und dort bis zur weiteren Versuchsdurchführung gelagert werden. Anschließend wurden die Zellen in 0.5 mL Puffer I ohne BSA und 10 μ L PI abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse erfolgte für 30 min bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler. Bei 17 000 g und 4 °C wurde unlöslicher Zelldebris für 10 min abzentrifugiert. Als Lysatprobe wurden 30 μ L vom Überstand abgenommen und mit 15 μ L 3x Lämmli versetzt. Der restliche Überstand wurde auf Neutravidin-*beads* gegeben und bei 4 °C für 1.5 h oder über Nacht auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am Vortag wurden pro Versuchsansatz 30 μ L Neutravidin-*beads* in 1 mL Puffer I mit BSA über Nacht auf dem Überkopfschüttler inkubiert und vor ihrem Einsatz zur Isolation dreimal mit Puffer I mit BSA gewaschen. Danach wurden die Proben auf Mobicol-Säulen überführt und je einmal in Puffer I mit BSA bis Puffer III und dreimal mit Puffer IV gewaschen (Zentrifugation bei 4 °C und 3500 g für 30 sec). Die

Mobiciol-Säulen wurden mit einer Kappe verschlossen und zur Elution der Oberflächenproteine mit 30 µL 2x Lämmli-Puffer in einem Wasserbad bei 95 °C für 7 min erhitzt. Die Kappe wurde abgenommen und die isolierten Proteine durch Zentrifugation bei 17 000 g eluiert. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot analysiert.

2.8.10. Metabolische Markierung und Radiographie

Um den Transport eines Proteins in der Zelle zu verfolgen, kann eine metabolische Pulsmarkierung angewendet werden. Dabei werden neu synthetisierte Proteine durch die Zugabe von radioaktivem ^{35}S -Methionin ins Zellkulturmedium markiert. Diese Markierung (*pulse*) erfolgt jedoch nur für einen zeitlich begrenzten Zeitraum. Anschließend wird das Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen für gewisse Zeiten weiter inkubiert (*chase*). Für die Proteinbiosynthese steht so nur noch unmarkiertes Methionin zur Verfügung (Lodish et al., 2008). Für die metabolische Markierung wurden polare, auf PET-Filter kultivierte MDCK-Zellen zuerst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 1 h in Methionin-freiem Medium kultiviert. Die Pulsmarkierung erfolgte durch Zugabe von 60 µCi ^{35}S -Methionin in die basolaterale Kulturkammer. Die Zellen wurden so für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, durch Normalmedium ersetzt und die Zellen für verschiedene Zeitintervalle weiter bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lysate weiter aufbereitet (siehe auch Abschnitt 2.9.9). Für die Radiographie wurden die Banden des Molekulargewichtstandards auf getrockneten Gelen mit einer 1:3500-Verdünnung von ^{35}S -Methionin/PBS markiert. Es wurde eine Phosphorimaging-Platte aufgelegt und 14 bis 21 Tage exponiert. Durch Anregung mit sichtbarem Licht mit Hilfe eines Phosphorimagers wurde die in der Phosphorplatte gespeicherte Energie als Lumineszenzsignal freigesetzt und detektiert.

2.9. Spezielle proteinbiochemische Methoden

2.9.1. Herstellung von rekombinantem Galektin-3

Mit Hilfe von gentechnisch veränderten Organismen können rekombinante Proteine hergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine hGal3 und hGal3C-TRX unter Verwendung von BL21 Star (DE3)-*E.coli* (New England Biolabs, Ipswich (USA)) erzeugt. Bei diesem Stamm wurde das Gen für die T7-RNA-Polymerase mit Hilfe des Lambda-Phagen DE3 in das Bakterienchromosom integriert. Die Expression der T7-RNA-Polymerase steht hierbei unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und kann durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden. Die T7-RNA-Polymerase wiederum induziert die Expression von Zielgenen unter Kontrolle des T7-Promotors auf T7-Expressionsvektoren, die in das Bakterium gebracht wurden. Zur Produktion von rekombinantem Galektin-3 konnte auf einen Tiefkühlstock von bereits mit pET3c-hGal3 oder pET3c-hGal3C-TRX transformierten BL21 Star (DE3)-*E.coli* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hakon Leffler, Lund (Schweden)) zurückgegriffen werden. Dafür wurden die Bakterien in 200 μ L LB-Medium über Nacht herangezogen und am nächsten Tag in 2 L LB-Medium weiter kultiviert, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0.5 erreicht war. Dann erfolgte durch Zugabe von 0.5 mM IPTG die Induktion der Galektin-3-Expression für 3 bis 4 h. Anschließend wurden die Bakterien bei 6000 rpm (Rotor JLA 16.250) für 15 min pelletiert und in 20 mL ME-PBS mit Proteaseinhibitor (1/2 Tablette *cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Ultraschallbehandlung (V70T, 80 % Amplitude, 10 sec *pulse*, 10 sec *rest*). Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 8000 rpm (Rotor JLA 8100) und 4 °C für 15 min entfernt und das gewonnene Lysat filtriert (Porengröße 0.45 μ m). Zur Isolation von Galektin-3 wurden 1 mL Laktosyl-*beads*/10 mL Lysat eingesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *beads* fünfmal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1000 rpm (Rotor SX4250) und 4 °C für 5 min) und anschließend mit 150 mM Laktose in PBS über 1 h eluiert. Nach erneuter Abzentrifugation der Laktosyl-*beads* wurde rekombinan-

tes Galektin-3 per Größenausschlusschromatographie mit Hilfe einer PD-10-Säule in PBS umgepuffert und die Konzentration durch eine OD₂₈₀-Messung bestimmt. Auf diese Weise hergestelltes rekombinantes Protein konnte nach schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert werden.

2.9.2. Eisenbeladung von Transferrin

Apo-Transferrin besitzt zwei Bindungsstellen für dreiwertiges Eisen (Fe^{3+}). Holo-Transferrin, bei welchem diese Bindungsstellen mit Fe^{3+} besetzt sind, bindet mit höherer Affinität an den Transferrinrezeptor als Apo-Transferrin und wird daher effizienter internalisiert (Fuller & Simons, 1986). Zur Eisenbeladung von Transferrin wurden zunächst $50\text{ }\mu\text{M}$ Eisencitrat hergestellt. Hierfür wurde Eisenchlorid (Stocklösung 100 mM in 5 M HCl) mit der hundertfachen Menge Natriumcitrat (Stocklösung 850 mM) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurden 2 mg Apo-Transferrin in $1\text{ mL } 1\text{ M NaHCO}_3$ pH 8 gelöst, das über Nacht hergestellte Eisencitrat ($50\text{ }\mu\text{M}$) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer inkubiert. Anschließend erfolgte die Konjugation von AlexaFluor555 wie in Abschnitt 2.9.3 aufgeführt.

2.9.3. Markierung rekombinanter Proteine

Verschiedene rekombinante Proteine wurden zur Visualisierung bei Experimenten mit fluoreszenzmikroskopischer Analyse mit AlexaFluor-Farbstoffen oder zur Aufreinigung aus Zelllysaten bei biochemischen Versuchen mit Biotin konjugiert. Hierfür wurden NHS-aktivierte AlexaFluor-Farbstoffe beziehungsweise NHS-aktiviertes Biotin verwendet. 2 mg rekombinantes hGal3, SNA oder Transferrin in 2 mL PBS wurden je nach Markierung mit $100\text{ }\mu\text{g}$ AlexaFluor555- oder AlexaFluor647-NHS-Ester beziehungsweise $200\text{ }\mu\text{g}$ Biotin-NHS-Ester für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer inkubiert (sowohl die AlexaFluor- als auch der Biotin-

NHS-Ester wurden zuvor in DMSO gelöst). Im Anschluss wurden die konjugierten Proteine mit Hilfe einer PD-10-Säule von überschüssigem Farbstoff oder Biotin befreit und nach Bestimmung der Konzentration direkt für Versuche eingesetzt oder nach schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

2.9.4. Funktionstest von aufgereinigtem Galektin-3

Zur Funktionsüberprüfung von aufgereinigtem, rekombinantem Galektin-3 wurde dessen Fähigkeit Glykoliganden zu komplexieren ausgenutzt (nach Lepur, Salomonsson et al. (2012)). Hierfür wurden in einer 96-Lochplatte 0 bis 200 μM Galektin-3 und 10 μM Asialofetuin (ASF) in PBS oder 0 bis 100 μM ASF und 20 μM Galektin-3 in einem Volumen von 50 μL gemischt. Die Trübung der Lösung durch Komplexbildung (Turbidität) wurde im Tecan Mikroplattenleser bei Raumtemperatur und einer Absorption von 350 nm gemessen.

2.9.5. Funktionstest von Holo-Transferrin

Um die Funktion des mit Fe^{3+} -beladenen und AlexaFluor555-gekoppelten Transferrins zu überprüfen wurde in polaren, auf PET-Filtern kultivierten MDCK-Zellen sowohl eine Eisenüberschuss (mit Eisenammoniumcitrat, englisch *ferric ammonium citrate* (FAC)) als auch eine Eisenmangelsituation (mit Deferoxamin (DFO)) simuliert. Dazu wurde das Kulturmedium mit 100 μM FAC (+ 300 μM Ascorbat zur Erhöhung der Löslichkeit), beziehungsweise 100 μM DFO versetzt und die Zellen damit über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine 30-minütige Internalisierung von Holo-Transferrin-Alexa555 (Tf-Alexa555) wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben induziert. Nicht internalisiertes Transferrin wurde mit PBS abgewaschen, die Zellen wie unter Abschnitt 2.10.1 erklärt fixiert und auf Objektträger aufgebracht.

2.9.6. Isolierung Membran-gebundener und internalisierter rekombinanter biotinylierter Proteine

In einigen Experimenten kamen rekombinante, biotinylierte Proteine zum Einsatz (vergleiche Abschnitt 2.7.3). Um die Bindungspartner dieser Membran-assoziierten oder endozytierten Proteine zu identifizieren, wurden diese mit Hilfe von Avidin-*beads* isoliert. Je nach Fragestellung wurde nach erfolgter Bindung an die Membran überschüssiges Biotin-markiertes Protein mit PBS⁺⁺ abgewaschen, beziehungsweise nach Ablauf der Internalisierung nicht endozytiertes Protein mit 150 mM Laktose (im Fall von hGal3-Biotin) oder 0.2 % Essigsäure (im Fall von hGal3- und SNA-Biotin) entfernt. Gegebenenfalls wurden Protein-Protein-Interaktionen vor dem Lysieren mit dem Crosslinker Dithiobis(Succinimidyl-Propionat) (DSP) stabilisiert. Dafür wurden die Zellen für 30 min mit 1 mM DSP (Stocklösung: 25 mM in DMSO) in 1 mL PBS bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen in 0.5 mL Puffer I ohne BSA und 10 µL PI. Die Lyse und die Aufreinigung über Neutravidin-*beads* erfolgte wie in Abschnitt 2.8.9 beschrieben. Im Anschluss wurden die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot analysiert.

2.9.7. Untersuchung der Endozytose von Oberflächenproteinen mit reduzierbarem Biotin

Die Untersuchung der Endozytose von Membranproteinen wurden mit Hilfe von reduzierbarem Biotin vorgenommen. Sulfo-NHS-SS-Biotin ist membranimpermeabel und enthält eine Disulfidbrücke im Spacerarm, welche durch Glutathion oder DTT gespalten werden kann. Konfluente und polare MDCK-Zellen wurden zu Versuchsbeginn viermal mit PBS⁺⁺ oder, sofern Galektin-3 während des Versuchs inhibiert werden sollte, zweimal mit 150 mM Laktose und zweimal PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend wurde die apikale Membrandomäne für 30 min bei 4 °C mit 1.2 mg/mL NHS-SS-Biotin/PBS⁺⁺ inkubiert. Überschüssiges Biotin wurde durch dreimaliges Waschen mit 0.1 M Glycin in PBS⁺⁺ inaktiviert und durch zwei weitere Waschschrte mit PBS⁺⁺ entfernt. Die Endozytose wurde für 30 min bei 37 °C in PBS⁺⁺

oder 50 mM Laktose/PBS⁺⁺ erlaubt. Danach wurde NHS-SS-Biotin von nicht internalisierten Biotin-markierten Oberflächenproteinen durch Reduktion entfernt. Dafür wurden die Zellen mit Glutathion-haltigem NHS-SS-Biotin-Reduktionspuffer für 30 min bei 4 °C inkubiert (siehe Abschnitt 2.5). Freie Sulfhydrylgruppen wurden durch zehnminütige Inkubation bei 4 °C mit 5 mg/mL Iodacetamid in PBS⁺⁺ besetzt. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben lysiert und biotinylierte Proteine mit Hilfe von Neutravidin-*beads* isoliert (siehe 2.8.9). Anschließend wurden die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot analysiert.

2.9.8. Glykosidase-Behandlung von Oberflächenproteinen

Um das Glykosylierungsmuster von Glykoproteinen zu untersuchen, können verschiedene Enzyme mit Spezifitäten für unterschiedliche Zuckerketten eingesetzt werden. Hier wurden mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung isolierte apikale und basolaterale Membranproteine (siehe 2.8.9) einer Glykosidase-Behandlung unterzogen. Apikal oder basolateral biotinylierte MDCK-Zellen von jeweils zwei Filtern im 6-Lochformat wurden nach der Zelllyse gepoolt, um ein größeres Ausgangsvolumen zu erhalten. Die Präzipitation erfolgte dementsprechend mit 60 µL Neutravidin-*beads*. Zur Elution wurden die *beads* in 50 µL Denaturierungspuffer (New England Biolabs) 10 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt und durch Zentrifugation bei 17 000 g in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Eluate wurden auf jeweils 5 Ansätze aufgeteilt und nach Herstellerprotokoll (New England Biolabs) mit Neuraminidase, Neuraminidase und O-Glykosidase, Endo H oder PNGase F behandelt. Anschließend wurden die Proben mit 3x Lämmli versetzt, 7 min bei 95 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

2.9.9. Transportstudie von $\beta 1$ -Integrin

Um die Transportkinetik von $\beta 1$ -Integrin an die beiden Membrandomänen sowie die Abhängigkeit dieses Vorgangs von Galektin-3 zu untersuchen, wurden MDCK WT und MDCK Δ Gal3-Zellen 5 bis 7 Tage auf PET-Filter kultiviert und mit 60 μ Ci 35 S-Methionin markiert (siehe 2.8.10). Gegebenenfalls wurden die MDCK Δ Gal3-Zellen während der *pulse*- und der *chase*-Periode mit 1.5 μ M hGal3 supplementiert (Zugabe ins apikale Medium). Rekombinantes Galektin-3 wurde dabei stündlich zugegeben. Nach Ablauf der jeweiligen *chase*-Perioden wurden die apikalen oder basolateralen Membranproteine wie unter 2.8.9 biotinyliert und die Platten über Nacht bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in vorgewärmten Puffer I ohne BSA und 10 μ L PI abgeschabt und lysiert. Nach erfolgter Lyse (wie unter 2.8.1) wurde zunächst $\beta 1$ -Integrin mittels Immunpräzipitation (siehe 2.8.8) isoliert. Die Elution von den IP-beads erfolgte allerdings hier durch Erhitzen in 40 μ L 5 % (w/v) SDS für 7 min bei 95°C . Die Eluate wurden mit 460 μ L Puffer I ohne BSA versetzt und anschließend mit Neutravidin-beads aufgereinigt (wie unter 2.8.9), um Plasmamembran-assoziiertes $\beta 1$ -Integrin zu isolieren. Die Proben wurden danach mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele getrocknet und per Radiographie analysiert (siehe Abschnitte 2.8.5 und 2.8.10).

<i>Preclearing-beads:</i>	1 μ L IgG	+ 50 μ L PGS-beads	
<i>IP-beads:</i>	1 μ L anti $\beta 1$ -Integrin (GTX128839)	+ 50 μ L PGS-beads	
	1 μ L IgG	+ 50 μ L PGS-beads	(Negativkontrolle)

2.10. Fluoreszenzmikroskopische Methoden

2.10.1. Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der durchgeführten Experimente am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (KLSM) wurden die Zellen fixiert und Dauerpräparate angefertigt. Die auf Deckgläschen oder PET-Filter kultivierten Zellen wurden zunächst dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und dann mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) (w/v) in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Gegebenenfalls erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342. Dazu wurden 0.5 µg/µL Hoechst in PBS für 10 min bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Hiernach wurde ebenfalls mit PBS⁺⁺ gewaschen. Waren die Zellen auf Filtereinsätzen kultiviert, wurden die Filter nun mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit der Zellseite auf ein Deckgläschen gelegt. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Mowiol auf einem Objektträger aufgebracht. Genauso wurden Zellen die auf Deckgläschen kultiviert waren eingedeckt.

2.10.2. Immunfluoreszenz

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen können endogene Proteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die zu präparierenden Zellen zunächst wie in Abschnitt 2.10.1 fixiert. Anschließend wurde die Zellmembran durch eine 20-minütige Behandlung mit 0.2 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ durch Inkubation mit 5 % Ziegen Serum (v/v) in PBS abgesättigt. Es folgte die Inkubation des Primärantikörpers in 5 % Ziegen Serum für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Nach viermaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurde ein entsprechender AlexaFluor-gekoppelter Sekun-

därantikörper für 30 min in PBS inkubiert. Im Anschluss daran konnten die Kerne gefärbt und Dauerpräparate angefertigt werden (siehe 2.10.1). Die verwendeten Antikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen können den Tabellen 2.3 und 2.4 auf Seite 37 entnommen werden.

2.10.3. Immunhistochemie

Zur Untersuchung der $\beta 1$ -Integrin-Lokalisation in der Mausniere wurden von in Paraffin eingebetteten und Carnoy-fixierten Nieren aus WT und Gal^{-/-} Mäusen Schnittpräparate angefertigt (zur Herkunft des Mausgewebes siehe (Colnot et al., 1998)). Der Paraffinblock wurde dazu vorher im Kühlschrank gelagert und während des Schneidens mit Eis gekühlt. Mit dem Mikrotom wurden 4 μ m dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden mit einem feuchten Pinsel von der Klinge angehoben und in ein 37 °C Wasserbad überführt. Dies ermöglichte die Streckung und Entfaltung der Schnitte und erleichterte das Aufziehen auf Polylysin-beschichtete Objektträger. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet und konnten am nächsten Tag für immunhistochemische Färbungen verwendet werden. Zunächst wurden die Paraffinschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Hierfür wurden sie nacheinander je 5 min in Xylol (Rotihistol) I, Xylol (Rotihistol) II und Isopropanol und dann je 3 min in 96 % Ethanol, 80 % Ethanol und 70 % Ethanol und schließlich 1-2 min in A.dest. inkubiert. Zur Demaskierung des Antigens wurden die Schnitte in einem vorgeheizten Dampfger in 10 mMTris/1 mM EDTA 10 min inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal 5 min in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht, welcher in „Antibody Diluent“ (Dako, Hamburg) verdünnt wurde. Für die Erstellung der Negativkontrolle wurde nur „Antibody Diluent“ auf den Schnitt gegeben. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal 5 min in PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper ebenfalls in „Antibody Diluent“ für 60 min bei Raumtemperatur erfolgte. Die

Kerne wurden durch Inkubation mit Hoechst 33342 für 5 min gefärbt. Anschließend wurden die Präparate dreimal in PBS und einmal in A.dest. gewaschen und mit Mowiol eingedeckt. Die verwendeten Antikörperverdünnungen sind in den Tabellen 2.3 und 2.4 auf Seite 37 aufgeführt.

2.10.4. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurden die fluoreszenzmikroskopischen Analysen mit einem KLSM durchgeführt. Der Vorteil der Konfokalmikroskopie gegenüber der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie ist die Abschirmung von Fluoreszenzsignalen außerhalb der Fokusebene. Dies gelingt durch den Einsatz einer Lochblende zwischen Objekt und Detektor. Eine weitere Lochblende befindet sich zwischen anregendem Laser und dem Objekt und ermöglicht eine punktförmige Fokussierung des Anregungslichts auf eine Stelle im Präparat. Besitzen Anregungs- und Detektionsblenden denselben Fokus, sind sie konfokal. Durch die punktförmige Anregung werden nur Fluorophore in einem kleinen Bereich des Präparats angeregt. Für die Bildaufnahme wird ein ausgewählter Bereich des Präparats Punkt für Punkt abgerastert (Conchello & Lichtman, 2005; Lichtman & Conchello, 2005). Die Bildaufnahmen erfolgten unter Verwendung der HCX PL APO CS 63x/1,4 OIL oder HCX PL APO CS 40x OIL Objektive, mit einer Auflösung von 512 x 512 Bildpunkten und jede Bildzeile wurde mindestens achtmal gescannt. Um einen *cross talk* zwischen den Kanälen zu verhindern, das heißt die Detektion eines Signals in dem Kanal eines anderen Fluorophors, wurden die Bilder im sequentiellen Modus aufgenommen. Dabei werden die Farbstoffe nacheinander angeregt und die entsprechenden Emissionen zeitlich getrennt detektiert. In Tabelle 2.5 sind die verwendeten Fluorophore aufgeführt.

Fluorophor	λ Anregung [nm]	λ Detektion der Emission [nm]
Hoechst 33342	405	410-470
AlexaFluor555	543	550-620
AlexaFluor647	633	640-700

Tabelle 2.5.: Für die Fluoreszenzmikroskopie verwendete Fluorophore. Bei Verwendung von mehreren Fluorophoren wurden die Detektionsgrenzen so gewählt, dass es zu keiner Überschneidung mit der Anregungswellenlänge eines anderen Fluorophores kommt.

2.11. Quantifizierungen und Statistik

2.11.1. Quantifizierung von Proteinbanden

Sollte eine statistische Auswertung der Westernblot- oder Radiographiesignale erfolgen, so wurden diese zunächst mit Hilfe der LabImage 1D-Software densitometrisch quantifiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die gemessenen Signale nicht im Sättigungsbereich des Bildaufnahmesystems lagen (bei Westernblots) und eine geeignete Hintergrundreduktion durchgeführt (Basislinie bei einheitlichem Hintergrund, rollender Ball bei variablem Hintergrund).

2.11.2. Quantifizierung fluoreszenzmikroskopischer Versuche

Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe von Image J über das gesamte Bild gemessen. Für die Quantifizierung punktförmiger, $\beta 1$ -Integrin-positiver Strukturen unter Ausschluss der Zellgrenzen wurde mit Hilfe der Volocity Software ein Messprotokoll erstellt, um automatisch vesikuläre Strukturen zu bestimmen. Dabei wurden die Bereiche der Zellgrenzen ausgeschlossen und nur solche Strukturen ausgewertet die eine Größe von mindestens $0.03 \mu\text{m}^2$ aufwiesen.

2.11.3. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Software. Dazu wurden die Daten aus mindestens drei Experimenten, die unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, verwendet. Sollten zwei Gruppen verglichen werden, wurde für die Signifikanzanalyse ein ungepaarter t-Test gewählt. Galt es mehrere Gruppen, wie etwa in einer Zeitreihe miteinander zu vergleichen, wurde für den Test auf statistische Signifikanz eine einfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Test durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Polare Verteilung von Galektin-3 in Epithelzellen

Galektin-3, ein lösliches und im Zytosol synthetisiertes Protein, besitzt zahlreiche zelluläre Aufgaben. Unter anderem spielt es auch bei polaren Zellprozessen eine Rolle. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass es als Sortierrezeptor im apikalen *lipid raft*-unabhängigen Proteintransport dient (Delacour et al., 2006; Delacour, Greb et al., 2007). Um dieser Funktion nachzukommen, muss Galektin-3 im endosomalen System vorliegen. In der Arbeit von Straube et al. (2013) konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres Galektin-3 durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden kann und anschließend im apikalen Transport neu synthetisierter Membranproteine zur Verfügung steht. Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob die Endozytose von Galektin-3 grundsätzlich an beiden Membrandomänen stattfinden kann, oder auf eine Membrandomäne beschränkt ist.

3.1.1. Galektin-3 wird ins apikale Medium sekretiert

Galektin-3 wird über einen unkonventionellen Mechanismus ins extrazelluläre Milieu sekretiert (Lindstedt et al., 1993; Sato et al., 1993). Daher wurde als erstes untersucht, ob dies in polaren Epithelzellen an beiden Membrandomänen erfolgt, oder ob die Sekretion vornehmlich an einer Domäne zu beobachten ist. Hierfür wurden die apikalen und basolateralen Medien von auf PET-Filtern kultivierten MDCK-Zellen gesammelt und per Westernblot

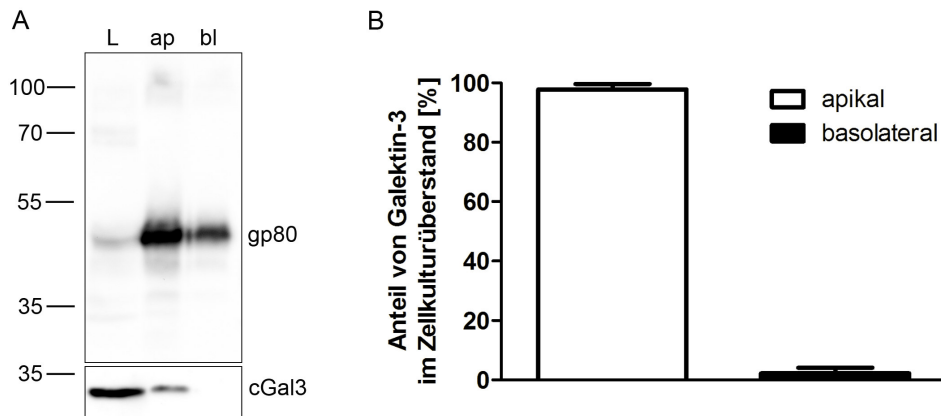


Abbildung 3.1.: Sekretion von Galektin-3 in polaren MDCK-Zellen. A) Apikale und basolaterale Medien von auf PET-Filter kultivierten MDCK-Zellen wurden nach 4 h Sekretion bei 37°C gesammelt und per Immunoblot untersucht. B) Die Anteile von sekretiertem Galektin-3 in apikalen und basolateralen Medien wurde auf die Menge im Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

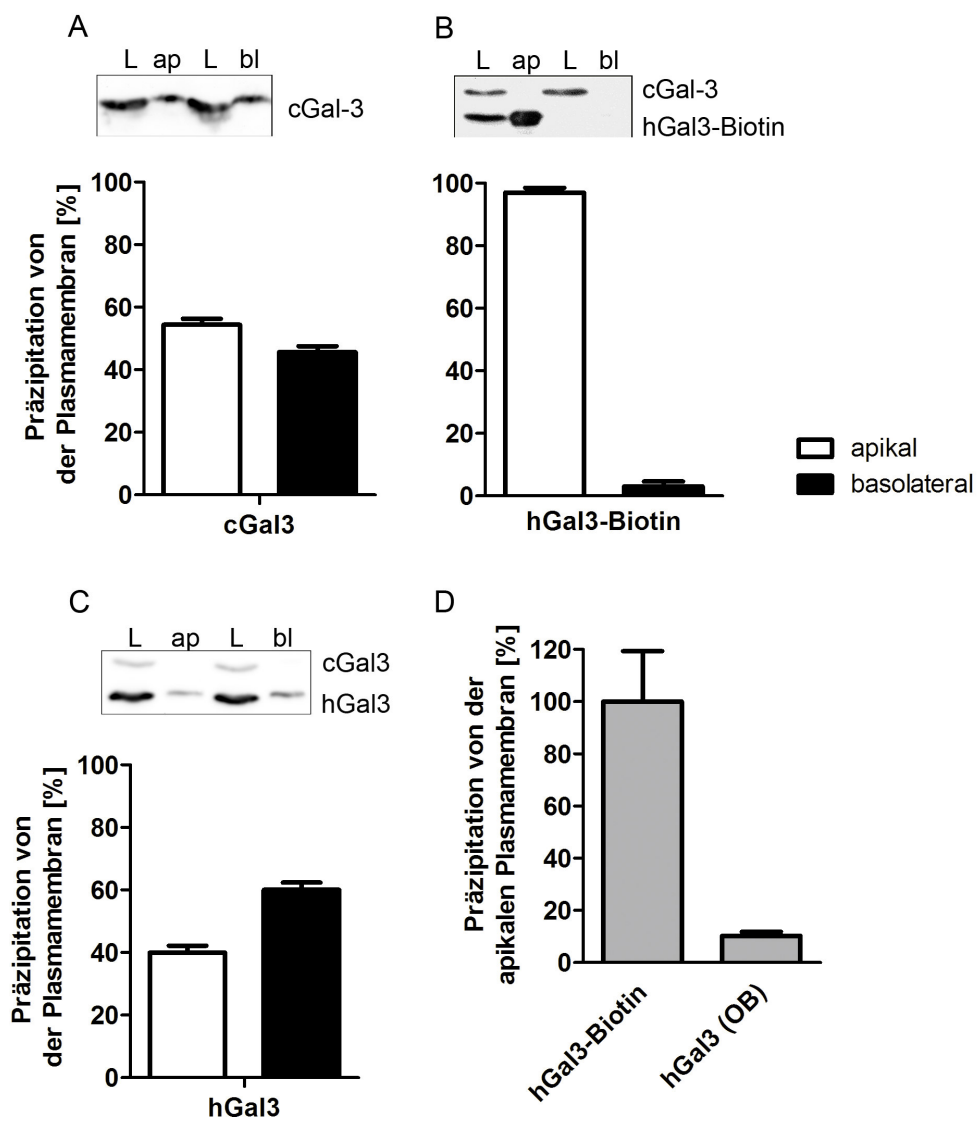
untersucht. Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, wurde Galektin-3 hauptsächlich im apikalen Medium gefunden und lediglich 2% des sekretierten Galektin-3 wurden im basolateralen Überstand detektiert. Als Kontrollprotein wurde Clusterin/gp80 detektiert, welches vor allem apikal sekretiert wird, aber auch im basolateralen Medium zu finden ist (Urban et al., 1987). Durch diese Ergebnisse kann die von Lindstedt et al. (1993) demonstrierte apikale Sekretion von Galektin-3 in MDCK-Zellen bestätigt werden.

3.1.2. Galektin-3 bindet an die apikale Plasmamembran

Im folgenden Experiment wurde die Assoziation von Galektin-3 mit der Plasmamembran untersucht. Mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung lassen sich gezielt apikale beziehungsweise basolaterale Membranproteine sowie Membran-assoziierte Proteine markieren und isolieren. Wie in Abbildung 3.2A gezeigt, konnte endogenes Galektin-3 an beiden Membrandomänen gleichermaßen detektiert werden. Um nicht nur die Proteinkomponente, sondern auch andere Bestandteile der Membran wie Lipide zu berücksichtigen, wurde die Bindung

von rekombinantem, biotinyliertem Galektin-3 an die Plasmamembran untersucht. Exogenes Galektin-3 band hauptsächlich an die apikale Membran und lediglich 3 % konnten von der basolateralen Domäne präzipitiert werden (Abbildung 3.2B). Hierbei ist zu beachten, dass die unter 3.2B verwendeten Galektin-3 Mengen die physiologischen Konzentrationen um ein Vielfaches übersteigen (eine Einordnung der im Experiment verwendeten und endogenen Galektin-3 Level ist in Abschnitt A.1.1 auf Seite x gegeben). Daher wurde getestet, wie es sich mit der Bindung von größeren Mengen Galektin-3 an die Proteinkomponente der Plasmamembran verhält. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Membrandomänen zunächst mit Biotin markiert und anschließend mit rekombinantem Galektin-3 inkubiert. Abbildung 3.2C zeigt, dass hier eine ähnliche Verteilung wie für endogenes Galektin-3 beobachtet werden konnte (vergleiche 3.2A). Beim direkten Vergleich der durch Neutravidin-*beads* apikal präzipitierten Galektin-3-Mengen fällt auf, dass bei Inkubation mit hGal3-Biotin etwa zehnmal mehr Protein isoliert wird, als bei Inkubation mit hGal3 nach Markierung der Oberflächenproteine mit Biotin (Abbildung 3.2D). Diese Beobachtung zeigt, dass die effiziente Bindung des Lektins an die apikale Membran nicht alleine durch die Bindung an Membranproteine zustande kommt, sondern die Beteiligung anderer Membrankomponenten, wie Lipide, involviert.

Abbildung 3.2. (nächste Seite): Assoziation von Galektin-3 mit der Plasmamembran. Die Bindung von endogenem (cGal3) und exogenem, rekombinantem (hGal3 und hGal3-Biotin) Galektin-3 wurde in polaren, auf PET-Filter gewachsenen MDCK-Zellen untersucht. Die mit Biotin markierten Proteine wurden mit Hilfe von Neutravidin-*beads* isoliert und die Verteilung von Galektin-3 per Westernblot analysiert. Hierfür wurde ein polyklonaler anti Galektin-3 Antikörper verwendet. **A)** Membranproteine und Membran-assoziierte Proteine der apikalen oder basolateralen Domäne wurden mit Biotin markiert. Mittelwert + SD, n=2. **B)** Die apikale oder basolaterale Plasmamembran wurden mit 1.5 μ M rekombinantem, biotinylierten Galektin-3 (hGal3-Biotin) bei 4 °C inkubiert. Mittelwert + SD, n=5. **C)** Es erfolgte zunächst eine Oberflächenbiotinylierung wie in A) und anschließend eine Inkubation mit 1.5 μ M rekombinantem Galektin-3 (hGal3) bei 4 °C vor der Zelllyse. Die Galektin-3-Level an der jeweiligen Membrandomäne wurden auf die Galektin-3-Menge im entsprechenden Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral. **D)** Direkter Vergleich von apikal präzipitiertem hGal3-Biotin (wie in B) und hGal3 bei der Oberflächenbiotinylierung (wie in C). Die Galektin-3-Level an der apikalen Membran wurden auf die Galektin-3-Mengen im entsprechenden Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. Um die jeweils präzipitierten Proteinmengen direkt zu vergleichen, wurden die Werte auf apikal präzipitiertes hGal3-Biotin bezogen.



Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine polare Orientierung von Galektin-3 in MDCK-Zellen. Neben der apikalen Sekretion des Lektins erfolgt auch die Assoziation mit der Plasmamembran hauptsächlich an dieser Domäne.

3.2. Interaktionspartner von Galektin-3 an der apikalen

Membran

In unpolaren Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur Glykoproteine, sondern auch Glykolipide an der Membranassoziation und Endozytose von Galektin-3 beteiligt sind (Lakshminarayan et al., 2014). Durch die interessante Beobachtung, dass Galektin-3 in polaren MDCK-Zellen vorwiegend an die apikale Membran bindet, stellte sich die Frage, welche Bindepartner hier bei der Membranassoziation beteiligt sind.

3.2.1. Identifizierung von Integrinen als apikale Bindepartner für Galektin-3

Zur Identifizierung möglicher proteinogener Bindepartner von Galektin-3 wurde die apikale Domäne konfluenten MDCK-Zellen mit rekombinantem, biotinylierten Galektin-3 inkubiert. Die Membranbindung erfolgte bei 4°C um eine Internalisierung zu verhindern. Nach anschließender Zelllyse wurde hGal3-Biotin gemeinsam mit möglichen Interaktionspartnern mit Hilfe von Neutravidin-*beads* isoliert. Die Präzipitate wurden per Massenspektrometrie analysiert. In Abbildung 3.3 sind die so identifizierten Proteinbanden mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Neben dem zur Präzipitation eingesetzten rekombinanten, humanen Galektin-3 wurde auch endogenes, canines Galektin-3 gefunden. Desweiteren wurden $\alpha 2$ -Integrin und in einem zweiten Experiment $\alpha 3$ -Integrin (siehe Tabelle A.3 auf Seite xiii) als Galektin-3-Bindepartner detektiert. Die in der Massenspektrometrie gefundene Assoziation von Galektin-3 mit $\alpha 2$ -Integrin sollte in einem nächsten Experiment bestätigt werden. Da aus der Literatur bekannt ist, dass Galektin-3 auch $\beta 1$ -Integrin binden kann (Furtak et al., 2001; Lakshminarayan et al., 2014), wurde auch diese Interaktion mittels einer Co-Immunopräzipitation untersucht. Beide Vertreter der Integrin-Familie co-präzipitierten in MDCK-Zelllysaten mit Galektin-3 (Abbildung 3.4).

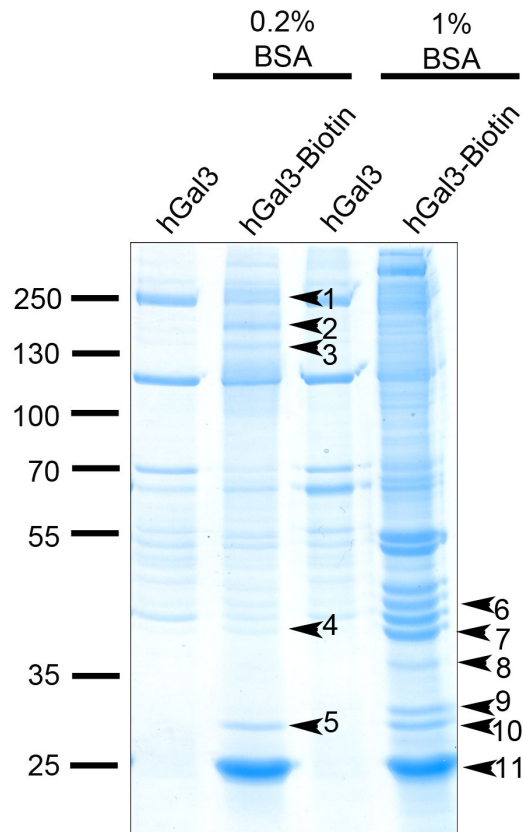


Abbildung 3.3.: Ermittlung apikaler Bindepartner für Galektin-3. Zur Identifizierung potentieller Galektin-3-Bindepartner wurden die apikalen Membrandomänen polarer MDCK-Zellen bei 4 °C mit 1.5 μ M hGal3 (als Kontrolle) oder hGal3-Biotin inkubiert. Membran-gebundenes hGal3-Biotin wurde unter Anwesenheit von 0.2 % oder 1 % BSA isoliert und co-präzipierende Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert. Pfeilspitzen kennzeichnen identifizierte Banden. 1 – Lymphocyte antigen 75, 2 – Thrombospondin-1, 3 – Integrin α 2, 4 – Keratin, 5 – Galektin-3, 6 – Keratin, 7 – Keratin, 8 – Clusterin/gp80, 9 – Annexin A2, 10 – Galektin-3, 11 – Galektin-3 (human). Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

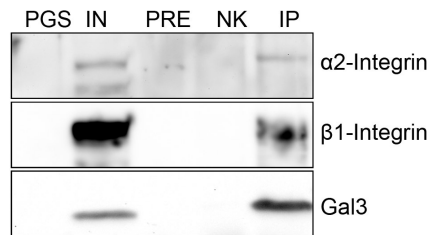


Abbildung 3.4.: Co-Immunpräzipitation von Integrinen und Galektin-3. MDCK-Zellen wurden lysiert und es wurde eine Immunpräzipitation mit einem gegen Galektin-3 gerichteten Antikörper durchgeführt. Die durch Sepharose-beads isolierten Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und Galektin-3, sowie $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Integrin wurden im Westernblot detektiert. PGS = Protein G Sepharose-beads, IN = Input (Lysat), PRE = Preclearing, NK = Negativkontrolle, IP = Immunpräzipitation. n=1 für $\alpha 2$ -Integrin, n=3 für $\beta 1$ -Integrin.

3.2.2. Galektin-3 bindet Zucker- und pH-abhängig apikal exprimierte Integrine

Als nächstes sollte die beobachtete Bindung von Galektin-3 an apikales $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Integrin verifiziert werden. Hierzu wurden die apikalen oder basolateralen Membrandomänen polarer, auf Filtereinsätzen kultivierter MDCK-Zellen bei 4 °C mit rekombinantem und biotinylierten Galektin-3 inkubiert. Apikal oder basolateral gebundenes hGal3-Biotin wurde durch Neutravidin-beads isoliert und co-präzipitierte Integrine mittels Westernblot detektiert. Wie bereits in Abbildung 3.2 dargestellt, band Galektin-3 auch in dieser Versuchreihe hauptsächlich an die apikale Domäne (Abbildung 3.5A). Sowohl $\alpha 2$ - als auch $\beta 1$ -Integrin konnten zusammen mit dem Lektin von der apikalen Membran isoliert werden. Galektin-3 bindet in geringem Maße auch an die basolaterale Membran. So konnten auch kleinere Mengen $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Integrin von dieser Domäne co-präzipitiert werden. Desweiteren wurde untersucht, unter welchen Bedingungen die Interaktion von Galektin-3 mit $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Membran stattfindet. Zu diesem Zweck wurde die Versuchreihe unter Anwesenheit von 50 mM Laktose und bei einem pH Wert von 4,5 durchgeführt. Abbildung 3.6 veranschaulicht, dass unter beiden Bedingungen die Bindung von Galektin-3 an die Membran, und somit auch die Co-Präzipitation von $\beta 1$ -Integrin, nicht stattfindet.

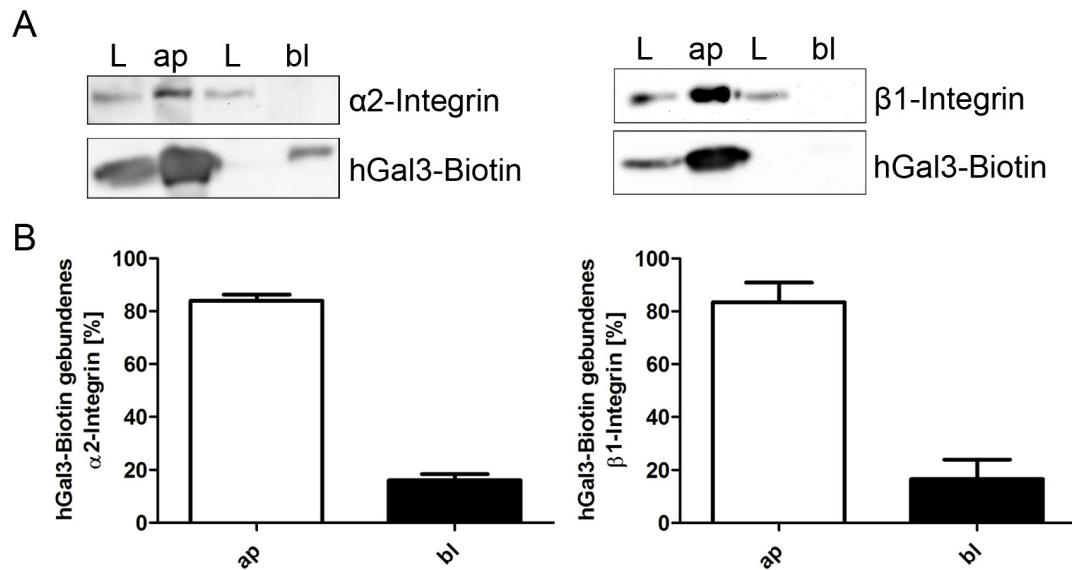


Abbildung 3.5.: Co-Präzipitation von Galektin-3 und Integrinen an den jeweiligen Membrandomänen. **A)** Membran-gebundenes hGal3-Biotin wurde von den apikalen oder basolateralen Domänen polarer MDCK-Zellen isoliert und co-präzipitierende Integrine wurden mittels Westernblot nachgewiesen. **B)** Quantifizierung von A. Die von Galektin-3 gebundenen Integrinlevel an der jeweiligen Membrandomäne wurden auf die Integrinmengen im entsprechenden Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral.

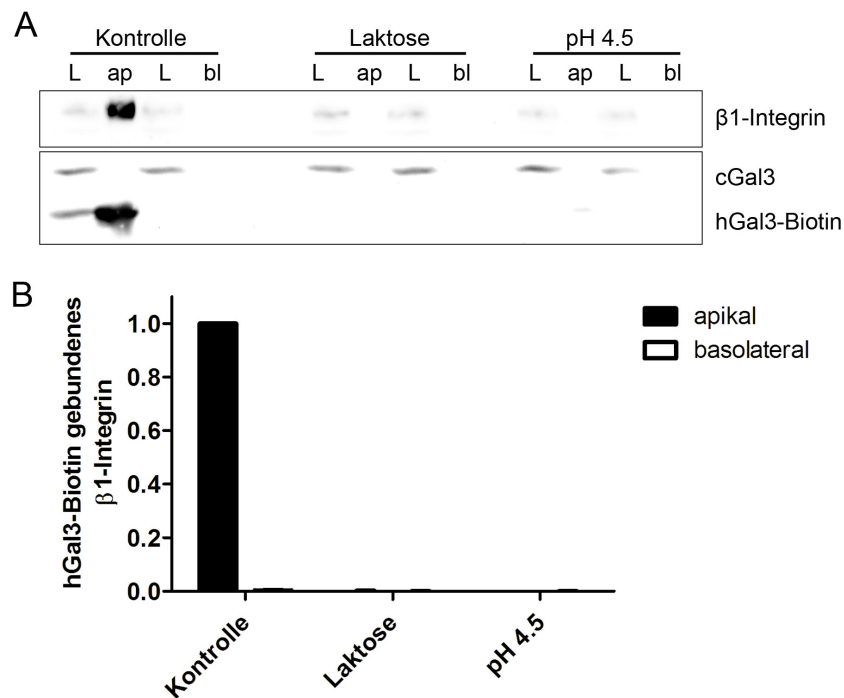


Abbildung 3.6.: Inhibierung der Galektin-3-Integrin-Interaktion. **A)** Zu den apikalen oder basolateralen Domänen polarer MDCK-Zellen wurde wie in Abbildung 3.5 1.5 μ M hGal3-Biotin gegeben. Die Inkubation mit hGal3-Biotin erfolgte in PBS⁺⁺ (Kontrolle), 50 mM Laktose oder in 0.2 % Essigsäure (pH 4,5). Membran-gebundenes hGal3-Biotin wurde isoliert und co-präzipitierendes β 1-Integrin wurde per Westernblot detektiert. **B)** Quantifizierung von A. Die von Galektin-3 gebundenen Integrinmengen an der jeweiligen Membrandomäne wurden zunächst auf die Integrinlevel im dazugehörigen Lysat normalisiert. Um den Anteil co-präzipitierten β 1-Integrins unter den verschiedenen Versuchsbedingungen zu vergleichen, wurde die Menge an apikal gebundenem β 1-Integrin unter Kontrollbedingungen gleich 1 gesetzt. Mittelwert + SD, n=3. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral.

Diese Experimente identifizieren zwei Vertreter der Integrin-Familie, $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Integrin, als Bindepartner für Galektin-3 an der apikalen Plasmamembran polarer MDCK-Zellen. Galektin-3 ist in der Lage, apikal lokalisierte $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Integrine Zucker- und pH-abhängig zu binden.

3.3. Lokalisation von Integrinen

Integrine sind unter anderem wichtiger Bestandteil der Fokalen Adhäsionen und damit für die Zelladhäsion verantwortlich. Demnach ist eine vorwiegend basolaterale Lokalisation für die Vertreter dieser Proteinfamilie zu vermuten. Aus diesem Grund sollte als nächstes die Lokalisation von Integrinen im Nierenzellkulturmodell (MDCK-Zellen), sowie im Nierengewebe der Maus analysiert werden.

3.3.1. Eine Minderzahl der Integrine ist in MDCK-Zellen an der apikalen Membran lokalisiert

Zur Untersuchung der Verteilung von $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Integrin an den apikalen und basolateralen Domänen in MDCK-Zellen, wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. Isolierte Membranproteine wurden mittels Immunoblot nachgewiesen. Abbildung 3.7 zeigt, dass sowohl $\alpha 2$ - als auch $\beta 1$ -Integrin zum größten Teil an der basolateralen Domäne detektiert wurden. Dennoch konnten etwa 30 % der exprimierten $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Integrine von der apikalen Membran isoliert werden.

3.3.2. Galektin-3 kolokalisiert mit $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Membran von MDCK-Zellen

Heterodimere, welche die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit enthalten, gehören zu der in der Niere am häufigsten vorkommenden Gruppe der Integrine (Kreidberg & Symons, 2000). Dabei sind zahlreiche Kombinationen mit verschiedenen α -Untereinheiten möglich. Da bei den weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit keine Beschränkung auf ein spezielles Heterodimer vorgenommen werden sollte, wurde im Folgenden ausschließlich die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit analysiert. Die Lokalisation von $\beta 1$ -Integrin in MDCK-Zellen wurde neben der Analyse der Oberflächenverteilung auch immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die

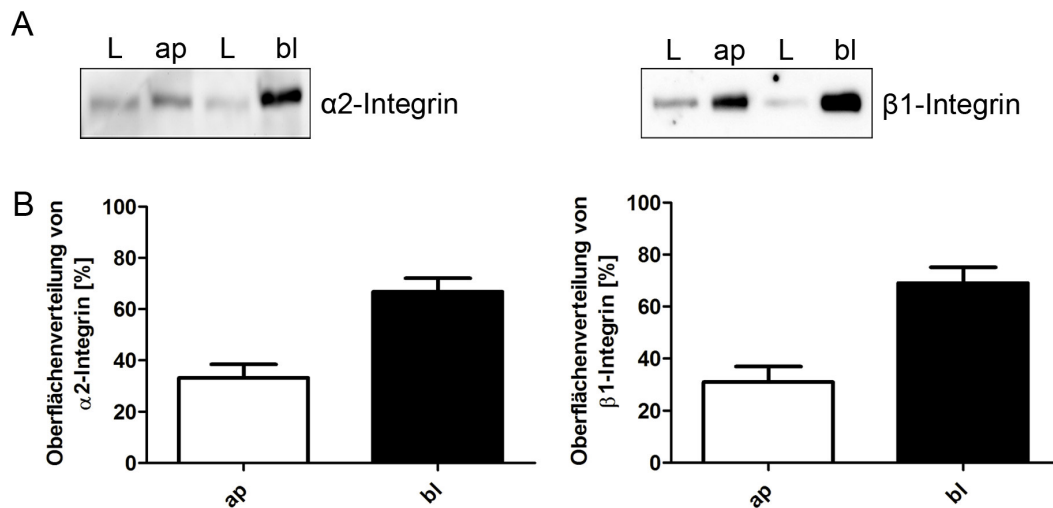


Abbildung 3.7.: Oberflächenverteilung von α2- und β1-Integrin in MDCK-Zellen.

A) Oberflächenbiotinylierung polarer MDCK-Zellen zur Ermittlung der Verteilung von α2- und β1-Integrin an der apikalen und basolateralen Plasmamembran. **B)** Quantifizierung von A. Die von der Zelloberfläche präzipitierten Integrinlevel an der jeweiligen Membrandomäne wurden auf die Integrinbanden im entsprechenden Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral.

Bildgebung mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie erlaubt die Erstellung optischer Schnitte des Präparats in der Fokusebene. So konnte hier die apikale Plasmamembran beziehungsweise der subapikale Bereich der gefärbten Zellen betrachtet werden. Die vorwiegend basolaterale Lokalisation von β1-Integrin konnte auch mit dieser Methode demonstriert werden (Abbildung 3.8). Außerdem konnten apikal einige punktförmige, β1-Integrin-positive Strukturen detektiert werden. Aufgrund der Mikrovilli-Auffaltungen wird dieses Punktmuster häufig für apikale Membranproteine in Epithelzellen beobachtet (Fuller & Simons, 1986; Schoenenberger et al., 1994; Straube et al., 2013). Exogen zugegebene Galectin-3 zeigte ähnliche Strukturen an der apikalen Plasmamembran und kolokalisiert mit β1-Integrin ebendort und im Bereich der Zellgrenzen (Abbildung 3.8A). Endogenes Galectin-3 konnte in vesikulären Strukturen in der apikalen oder subapikalen Region beobachtet werden. Einige dieser Galectin-3-Vesikel kolokalisierten mit β1-Integrin-positiven Strukturen (Abbildung 3.8B).

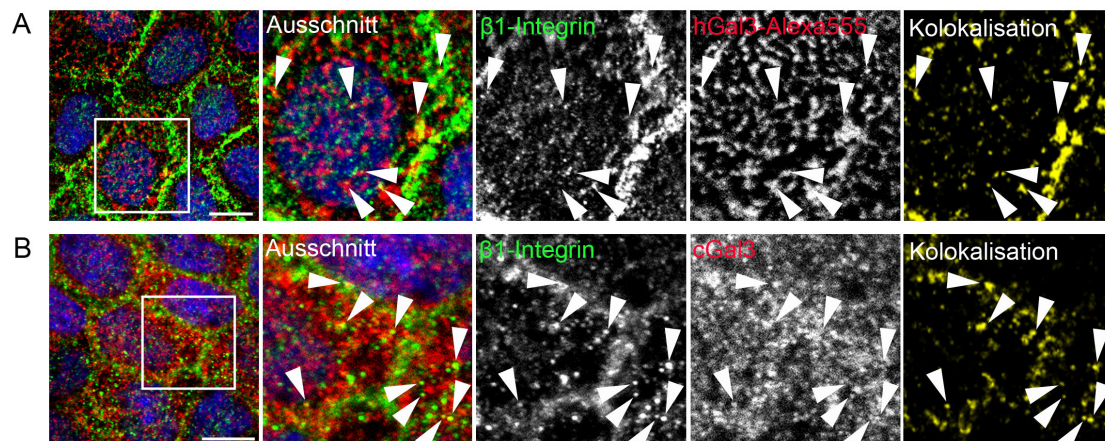


Abbildung 3.8.: Kolokalisation von Galektin-3 und β 1-Integrin an der apikalen Membrandomäne. **A)** Die Bindung von hGal3-Alexa555 (rot) an die apikale Membrandomäne polarer MDCK-Zellen erfolgte bei 4 °C, bevor die Zellen fixiert und permeabilisiert wurden. Anschließend wurde β 1-Integrin (grün) mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Die Zellkerne sind blau gefärbt. Zur Veranschaulichung kolokalisierender Strukturen sind rechts die positiven PDM (*product of the difference from the mean*)-Werte der Kanäle für β 1-Integrin und hGal3-Alexa555 dargestellt (gelb). Der PDM-Kanal wurde durch Verwendung der Software Volocity erstellt. Maßstab 10 μ m. n=3. **B)** Endogenes Galektin-3 (cGal3, rot) sowie β 1-Integrin (grün) wurden in polaren MDCK-Zellen per Immunfluoreszenz detektiert. Zellkerne sind blau gefärbt. Kolokalisierende Strukturen sind wie in A) durch den PDM-Kanal dargestellt (gelb). Maßstab 7.5 μ m. n=3.

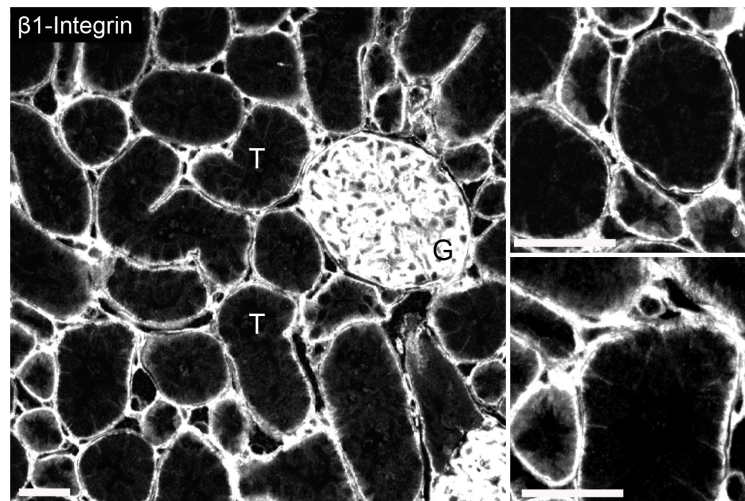


Abbildung 3.9.: Lokalisation von $\beta 1$ -Integrin in der Mausniere. Immunhistochemische Färbung von $\beta 1$ -Integrin (weiß) im Nierengewebe der Maus. Maßstab 25 μm . $n=3$. Zur Orientierung sind exemplarisch die Lumina zweier Tubuli markiert. T = Tubulus. G = Glomerulus.

3.3.3. In den Nierentubuli der Maus ist $\beta 1$ -Integrin hauptsächlich an der basolateralen Membran lokalisiert

Histologische Präparate aus dem Nierengewebe der Maus wurden ebenfalls auf die Expression und Lokalisation von $\beta 1$ -Integrin untersucht. Wie in Abbildung 3.9 zu sehen ist, konnte $\beta 1$ -Integrin ausschließlich basolateral detektiert werden. Dabei ist die basale Lokalisation am ausgeprägtesten.

Auch wenn in der adulten Mausniere $\beta 1$ -Integrin nicht an der apikalen Membran detektiert werden konnte, so konnte im MDCK-Zellmodell eine Kolo­kalisation von Galektin-3 und $\beta 1$ -Integrin im apikalen Bereich polarer Zellen beobachtet werden. Dabei ist zu beachten, dass apikal lokalisierte Integrin-Untereinheiten nur einen geringen Anteil der exprimierten Integrine darstellen, da sowohl $\alpha 2$ - als auch $\beta 1$ -Integrin hauptsächlich an die basolaterale Membran sortiert werden.

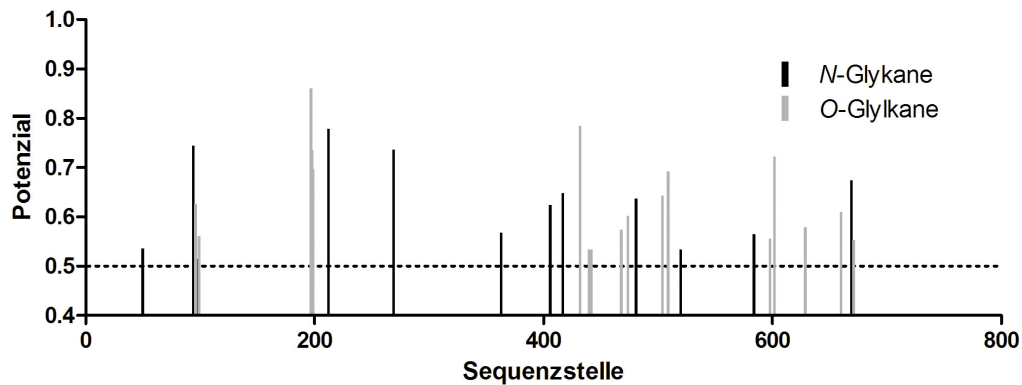


Abbildung 3.10.: Potentielle Glykosylierungsstellen von $\beta 1$ -Integrin. Potentielle *N*- und *O*-Glykosylierungsstellen für canines $\beta 1$ -Integrin wurden anhand der Aminosäureresequenz (UniprotKB: E2RT60) durch die Datenserver NetNGlyc (Version 1.0) und NetOGlyc (Version 4.0) ermittelt. Sequenzpositionen, die über einem Schwellenwert von 0.5 Potentialpunkten liegen (gestrichelte Linie), haben eine hohe Wahrscheinlichkeit, eine Glykanmodifikation zu tragen.

3.4. Glykosylierung von $\beta 1$ -Integrin

Als nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, ob und gegebenenfalls worin sich apikal und basolateral lokalisiertes $\beta 1$ -Integrin unterscheiden. Da es sich bei Galektin-3 um ein Zucker-bindendes Protein handelt, und außerdem die Zucker-abhängige Assoziation der beiden Proteine gezeigt werden konnte, lag es nahe, zunächst die Rolle der Glykosylierung von $\beta 1$ -Integrin zu untersuchen. Um einen ersten Überblick über mögliche Glykanmodifikationen des Proteins zu erhalten, können mit Hilfe von Datenbanken potentielle *N*- und *O*-Glykosylierungsstellen ermittelt werden (NetNGlyc Version 1.0 (Gupta et al., 2004) und NetOGlyc Version 4.0 (Steentoft et al., 2013)). Canines $\beta 1$ -Integrin besitzt demnach 12 potentielle *N*- und 17 mögliche *O*-Glykosylierungsstellen (siehe Abbildung 3.10). Hierbei ist zu beachten, dass es sich lediglich um theoretisch mögliche Glykosylierungsstellen handelt. Welche und wieviele dieser so ermittelten Stellen tatsächlich glykosyliert sind, kann hieraus nicht abgeleitet werden.

3.4.1. Apikal und basolateral lokalisierte β 1-Integrine tragen *N*-Glykane vom komplexen Typ

In einem ersten Experiment sollte das Glykosylierungsmuster von apikal und basolateral lokalisiertem β 1-Integrin verglichen werden. Dazu wurden zunächst Membranproteine der apikalen oder basolateralen Domäne mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung isoliert. Anschließend wurden sie einer Behandlung mit verschiedenen Glykosidasen unterzogen. Von den verwendeten Glykosidasen ist alleine die Peptid:N-Glykosidase F (PNGase F) in der Lage, die Kohlenhydratseitenketten von komplex glykosylierten Proteinen abzuspalten. Endoglykosidase (Endo H) dagegen entfernt Glykosylierungen nur von Glykoproteinen vom *high mannose*-Typ. Bestimmte *O*-Glykosylierungen können durch die *O*-Glykosidase gespalten werden. Allerdings müssen hierfür terminale Sialinsäuren zunächst mit der Neuraminidase entfernt werden (Freeze, 2001). In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse der Glykosidase-Behandlung dargestellt. Sowohl apikal, als auch basolateral isoliertes β 1-Integrin zeigten keine Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Endo H. Die Behandlung mit PNGase F führt in beiden Fällen zu einer Bandenverschiebung von etwa 130 auf 100 kDa. Nach Behandlung mit Neuraminidase ist in Abbildung 3.11A eine kleine Veränderung im Laufverhalten zu beobachten. Um diese Bandenverschiebung klarer darzustellen, wurden die Proben in einem weiteren Versuch über eine 8 % SDS-PAGE aufgetrennt (3.11B). Gegenüber einer Behandlung mit *O*-Glykosidase konnte keine Sensitivität festgestellt werden. Daraus ergeben sich keine Hinweise auf das Vorhandensein von *O*-Glykanen an β 1-Integrin. Demnach tragen sowohl die apikal als auch die basolateral lokalisierten β 1-Integrin-Spezies *N*-Glykosylierungen des komplexen Typs. *O*-verknüpfte Kohlenhydratseitenketten konnten nicht detektiert werden.

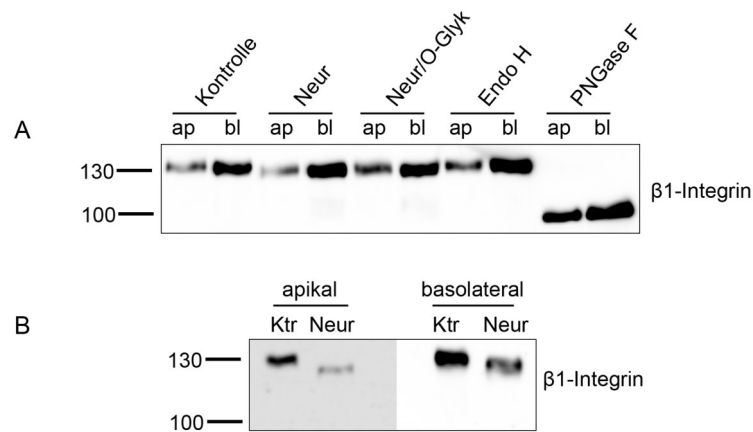


Abbildung 3.11.: Glykosidasebehandlung von apikal und basolateral lokalisiertem $\beta 1$ -Integrin. Apikal oder basolateral isolierte Membranproteine wurden mit Glykosidasen behandelt, in einer **A)** 10 % SDS-PAGE oder **B)** 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und $\beta 1$ -Integrin mittels Westernblot nachgewiesen. $n=3$. **B)** Die $\beta 1$ -Integrin-Signale der apikalen Fraktion sind zur besseren Sichtbarkeit der schwachen Banden mit erhöhtem Kontrast und geringerer Helligkeit dargestellt. $n=1$. ap = apikal, bl = basolateral, Neur = Neuraminidase (Sialidase), O-Glyk = O-Glykosidase, Endo H = Endoglykosidase H, PNGase F = Peptide:N-Glycosidase F. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

3.4.2. Apikal exprimierte $\beta 1$ -Integrine sind α -(2,6)-sialyliert

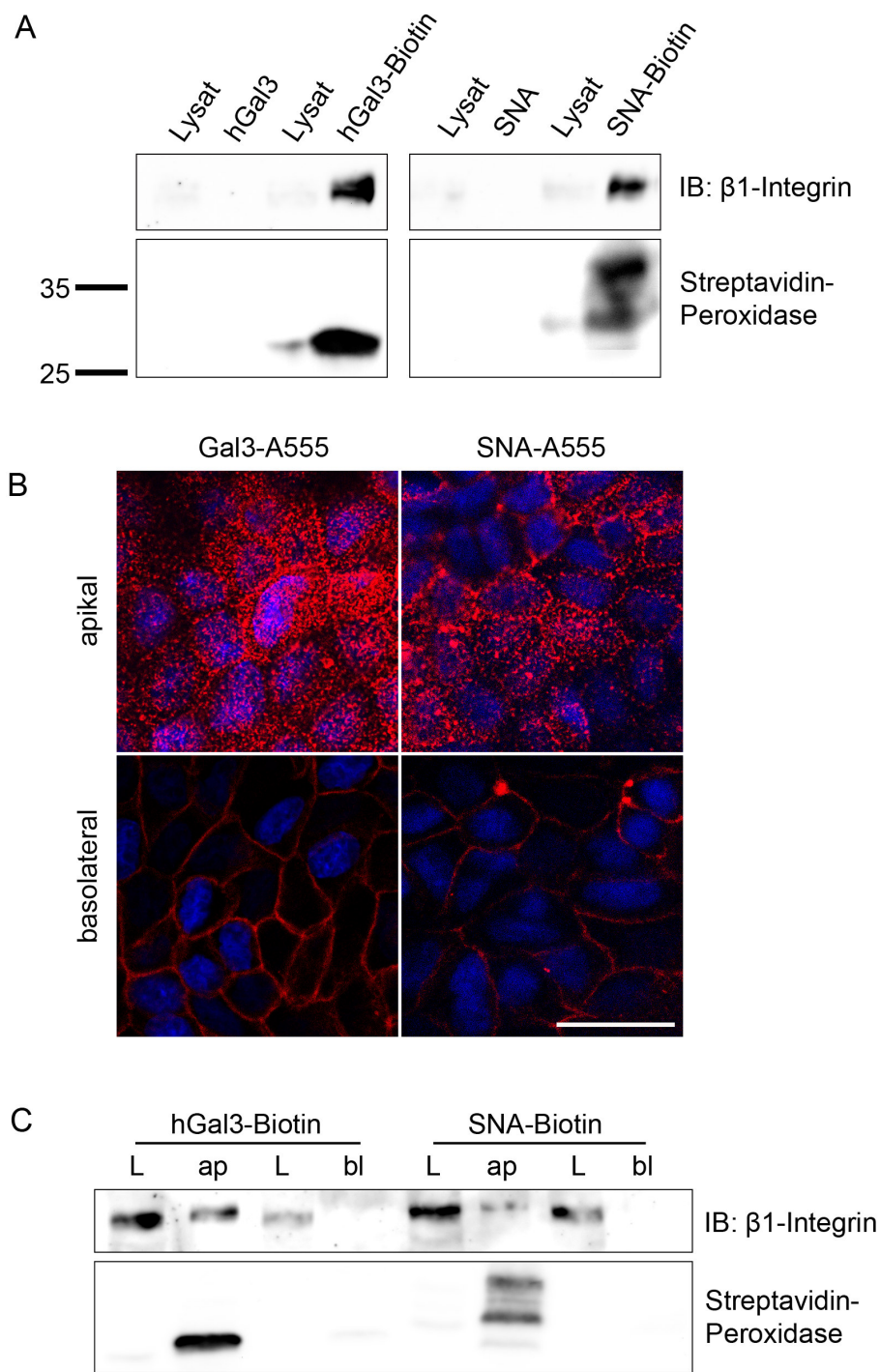
Die recht grobe Analyse des Glykosylierungsstatus von $\beta 1$ -Integrin mit Hilfe der hier verwendeten Glykosidasen ergibt keinen Aufschluss über die genaue Zusammensetzung der Zuckermodifikationen. Durch Neuraminidase-Behandlung werden α -(2,3)-, α -(2,6)- und α -(2,8)-verknüpfte Sialinsäuren von Glykanen abgespalten. Zur detaillierteren Untersuchung der glykosidischen Bindung der terminalen Sialinsäuren an $\beta 1$ -Integrin wurde das Lektin *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA) eingesetzt, welches präferenziell α -(2,6)-verknüpfte Sialinsäuren bindet (Akimoto et al., 2009). In einem Vorexperiment sollte getestet werden, ob $\beta 1$ -Integrin aus einem Gesamtzelllysats mit SNA präzipitiert werden kann. Biotinyliertes Galektin-3 oder SNA wurden zu MDCK-Zelllysaten gegeben und 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend mit Hilfe von Neutravidin-beads isoliert. Als Negativkontrolle diente jeweils unkonjugiertes Lektin. Abbildung 3.12A zeigt, dass sowohl durch Galektin-3 als auch durch SNA $\beta 1$ -Integrin aus dem Zelllysats präzipitiert werden konnte. Als

nächstes wurden auf PET-Filter kultivierte MDCK-Zellen von der apikalen oder basolateralen Domäne mit Alexa555-markiertem SNA inkubiert und mit dem KLSM betrachtet. Die Lokalisation von SNA-Alexa555 wurde mit der von Alexa-markiertem Galektin-3 verglichen (siehe Abbildung 3.12B). Beide Lektine zeigten eine starke apikale Färbung, gekennzeichnet durch das typische durch die Mikrovilli-bedingte Punktemuster (vergleiche hierzu auch Abschnitt 3.3.2). Basolateral konnte dagegen nur eine vergleichsweise schwache Färbung beobachtet werden. Die Bindung der Lektine an die beiden Membrandomänen wurde auch biochemisch untersucht (Abbildung 3.12C). SNA-Biotin konnte ebenso wie Galektin-3-Biotin von der apikalen, aber nicht von der basolateralen Plasmamembran isoliert werden. In beiden Fällen konnte β 1-Integrin co-präzipitiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass SNA, genauso wie Galektin-3, β 1-Integrin an der apikalen, aber nicht an der basolateralen Membran binden kann. Da SNA präferenziell α -(2,6)-verknüpfte Sialinsäuren bindet, sind zumindest ein Teil der apikal exprimierten β 1-Integrine α -(2,6)-sialyliert.

3.4.3. Glykosylierungsdefekte führen zu einer Fehlsortierung von β 1-Integrin

In einem nächsten Experiment wurde die Bedeutung der Glykosylierung für die Sortierung von β 1-Integrin in MDCK-Zellen analysiert. Hierfür wurde eine MDCK Mutante mit gestörter Glykosylierungsmaschinerie verwendet. MDCK RCA^r-Zellen weisen einen Defekt im UDP-Galaktose-Transporter im Golgi-Apparat auf. Dies führt zu einer starken Beeinträchtigung der

Abbildung 3.12. (nächste Seite): SNA-Bindung an β 1-Integrin **A)** Gesamtzelllysate wurden mit 0.3 μ M unkonjugiertem oder biotinyliertem hGal3 beziehungsweise SNA versetzt. Die biotinylierten Lektine wurden durch Neutravidin-beads isoliert und mittels Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen. Co-präzipitierendes β 1-Integrin wurde per Immunoblot nachgewiesen. n=2. **B)** Die apikalen oder basolateralen Membrandomänen polarer MDCK-Zellen wurden bei 4 °C mit 1.5 μ M Alexa555-markiertem hGal3 oder SNA (rot) inkubiert. Kerne sind in blau dargestellt. Maßstab 25 μ m. n=3. **C)** 0.3 μ M hGal3- oder SNA-Biotin wurden in die apikalen oder basolateralen Medien polarer MDCK-Zellen gegeben. Gebundenes Lektin-Biotin wurde mit Hilfe von Neutravidin-beads isoliert und mittels Streptavidin-Peroxidase detektiert. Co-präzipitierendes β 1-Integrin wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. n=3. IB = Immunoblot. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.



Galaktosylierung in dieser Zelllinie (Brändli et al., 1988; le Bivic et al., 1993). Zunächst sollte untersucht werden, welchen Einfluss dieser Defekt auf die polare Verteilung von Galektin-3 in den Epithelzellen hat. Wie unter Abschnitt 3.1 bereits für MDCK WT-Zellen durchgeführt, wurde die Sekretion, Membranassoziation und die Endozytose von Galektin-3 an der apikalen Plasmamembran untersucht. Abbildung 3.13A zeigt, dass die Sekretion von Galektin-3 in MDCK RCA^f-Zellen wie in WT-Zellen hauptsächlich über die apikale Membrandomäne erfolgt. Allerdings konnte nur eine schwache Bindung des Lektins an die apikale Membran von MDCK RCA^f-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.13B). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 in MDCK RCA^f-Zellen kaum endozytiert wird (Abbildung 3.13C). Es bleibt festzuhalten, dass Galektin-3 in MDCK-RCA^f- genau wie in WT-Zellen an der apikalen Membran sekretiert wird, jedoch die Bindung an die apikale Membran und die Endozytose von dieser Domäne stark eingeschränkt sind.

Als nächstes wurde die Sortierung von β 1-Integrin in MDCK RCA^f-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, ist zunächst eine Veränderung im Laufverhalten von β 1-Integrin in MDCK RCA^f-Zellen zu beobachten. Hier konnte das Protein auf der Höhe von etwa 100 kDa detektiert werden, wohingegen Wildtyp- β 1-Integrin bei etwa 130 kDa erkannt wird. Desweiteren wurde eine verstärkte apikale Sortierung des Proteins beobachtet.

Zusammenfassend konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass Defekte in der Glykosylierungsmaschinerie der Zelle zu einer verstärkten apikalen Lokalisierung von β 1-Integrin führen. Die Bindung von Galektin-3 an die Zelloberfläche der Glykosylierungsmutante ist nicht effizient und das Lektin wird folglich nicht endozytiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass apikal sowie basolateral exprimierte β 1-Integrine *N*-Glykosylierungen vom komplexen Typ aufweisen. Dabei trägt zumindest ein Teil der apikal lokalisierten β 1-Integrin-Spezies α -(2,6)-glykosidisch verknüpfte terminale Sialinsäuren.

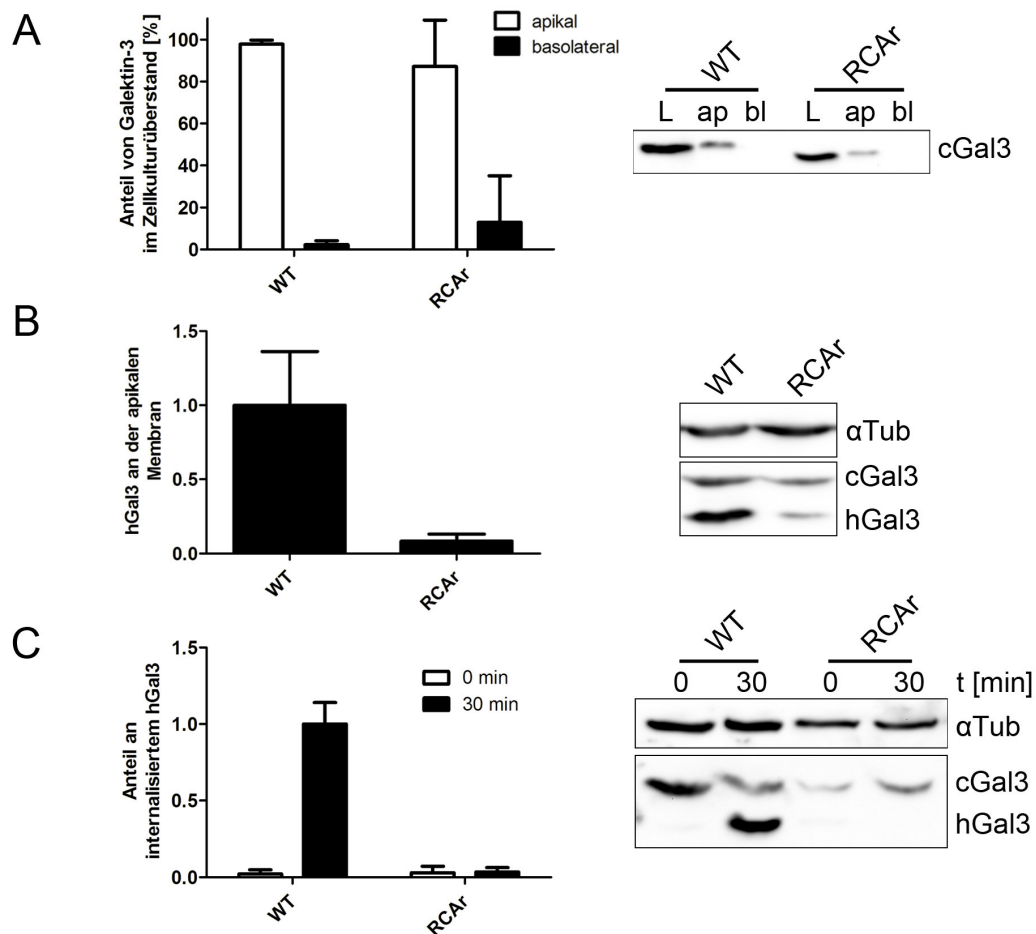


Abbildung 3.13.: Sekretion, Membranassoziation und Endozytose von Galektin-3 in MDCK RCA^f-Zellen. A) Apikale und basolaterale Überstände von MDCK WT- und RCA^f-Zellen wurden nach 4 h Sekretion bei 37 °C gesammelt und per Immunoblot untersucht. Die Anteile von sekretiertem Galektin-3 in apikalen und basolateralen Medien wurde auf die Menge im Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral. B) Die Bindung von Galektin-3 an die apikale Plasmamembran von MDCK WT- und RCA^f-Zellen wurde durch Inkubation mit 1.5 μ M hGal3 bei 4 °C getestet. Nach Abwaschen von ungebundenem Galektin-3 mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen lysiert und mittels Westernblot analysiert. Der Anteil von Galektin-3 an der jeweiligen apikalen Membran wurde auf die α -Tubulinmenge des entsprechenden Lysats normalisiert und ist als Vielfaches des Anteils in MDCK WT-Zellen dargestellt. Mittelwert + SD, n=4. C) Die Endozytose von 1.5 μ M hGal3 an der apikalen Membran wurde für 0 oder 30 min bei 37 °C induziert. Anschließend wurde nicht internalisiertes Galektin-3 mit 150 mM Laktose von der Zelloberfläche entfernt, die Zellen lysiert und mittels Westernblot untersucht. Der Anteil von endozytiertem Galektin-3 wurde auf die α -Tubulinmenge des entsprechenden Lysats normalisiert. Die Menge von nach 30 min aufgenommenem hGal3 in MDCK WT-Zellen wurde gleich 1 gesetzt. Mittelwert + SD, n=3.

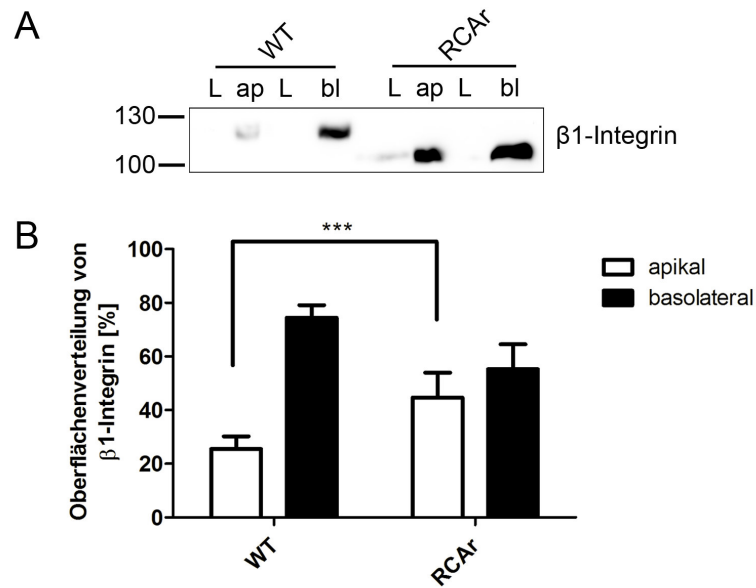


Abbildung 3.14.: Sortierung von $\beta 1$ -Integrin in MDCK RCA⁻-Zellen. A) Oberflächen-biotinylierung polarer MDCK WT- und RCA⁻-Zellen und Detektion von $\beta 1$ -Integrin im Immunoblot. B) Quantifizierung von A. Die von der Zelloberfläche präzipitierten Integrinlevel an der jeweiligen Membrandomäne wurden auf die Integrinbanden im entsprechenden Lysat normalisiert. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem ungepaarten t-Test. *** $p < 0.005$. Mittelwert + SD, $n=3$. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

3.5. Modulation der β 1-Integrin-Verteilung an der Plasmamembran durch Galektin-3

Im Folgenden sollte die Funktion der Interaktion zwischen Galektin-3 und β 1-Integrin untersucht und charakterisiert werden.

3.5.1. Erhöhte Galektin-3-Level steigern die β 1-Integrin-Expression

Dazu wurde zunächst der Einfluss der endogenen Galektin-3-Menge auf die Expression von β 1-Integrin untersucht. Hierfür wurden die β 1-Integrin-Expressionslevel in MDCK WT-Zellen und Galektin-3 überexprimierenden Zellen (MDCK Gal3-YFP) sowie Galektin-3 depletierten Zellen (MDCK Δ Gal3) verglichen (Abbildung 3.15). In MDCK Δ Gal3-Zellen, die keine Galektin-3-Expression aufweisen, wurden im Vergleich zu WT-Zellen geringere Level von β 1-Integrin detektiert. Dahingegen konnte in MDCK Gal3-YFP-Zellen trotz einer moderaten Überexpression des Lektins (Faktor 2) eine signifikante Verstärkung der β 1-Integrin-Expression festgestellt werden.

3.5.2. Galektin-3 verstärkt die apikale Lokalisation von β 1-Integrin

Da bereits bekannt war, dass Galektin-3 als Sortierrezeptor im *lipid raft*-unabhängigen apikalen Transport eine wichtige Rolle spielt (Delacour et al., 2006; Delacour, Greb et al., 2007), sollte als nächstes ein möglicher Einfluss von Galektin-3 auf die Verteilung des Integrins an den beiden Membrandomänen analysiert werden. Hierfür wurden MDCK WT-, Gal3-YFP- und Δ Gal3-Zellen einer Oberflächenbiotinylierung unterzogen (siehe Abbildung 3.16). Im Vergleich zu WT-Zellen zeigten MDCK Gal3-YFP-Zellen eine verstärkte apikale Verteilung von β 1-Integrin (Abbildung 3.16A und B). Umgekehrt konnten in MDCK Δ Gal3-Zellen reduzierte Mengen von apikalem β 1-Integrin beobachtet werden (Abbildung 3.16C und D). In einem Rettungsexperiment wurden MDCK Δ Gal3-Zellen vor der Oberflächenbiotinylierung für 8 h

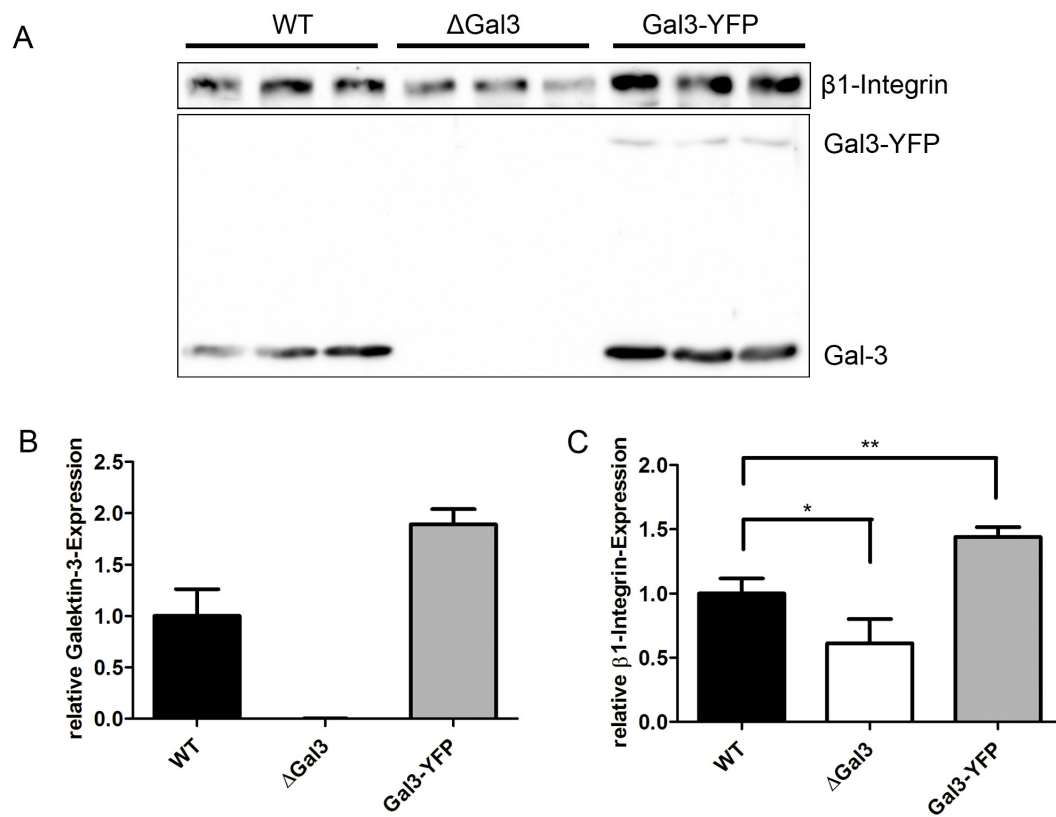


Abbildung 3.15.: Modulation der β 1-Integrin-Expression durch Galektin-3. A) Je 20 μ g Zelllysate von MDCK WT-, Δ Gal3- und Gal3-YFP-Zellen wurden per Westernblot auf die Expression von Galektin-3 und β 1-Integrin untersucht. B und C) Quantifizierung von A. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Expressionslevel von Galektin-3 (B) und β 1-Integrin (C) auf die jeweiligen WT-Level normalisiert. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem ungepaarten t-Test. * p < 0.05, ** p < 0.01. Mittelwert + SD, n=3.

mit Galektin-3 inkubiert. Die Zugabe von Galektin-3 erfolgte dabei stündlich, um eine potenzielle Degradation des rekombinanten Proteins zu berücksichtigen (Abbildung 3.16C und D, rechts). Diese Rettungskondition war ausreichend, um die apikalen $\beta 1$ -Integrin-Level wieder herzustellen und sogar über die WT-Situation hinaus zu erhöhen.

Der Effekt der stündlichen Zugabe von rekombinantem Galektin-3 ins apikale Medium von MDCK Δ Gal3-Zellen wurde auch mit Hilfe der Konfokalmikroskopie untersucht (Abbildung 3.17). Die Gesamtintensität $\beta 1$ -Integrin-positiver Signale in der subapikalen Region der Zellen war nach 8 h signifikant erhöht (3.17B). Außerdem wurde die Anzahl der punktförmigen Strukturen an oder nahe unterhalb der apikalen Membran bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, die Signale der stark gefärbten Zellgrenzen auszuschließen. Auch hierfür konnte ein signifikanter Anstieg festgestellt werden (3.17C).

Um zu überprüfen ob der Phänotyp von erhöhten apikalen $\beta 1$ -Integrin-Level nach Zugabe von Galektin-3 auch wieder umkehrbar ist, wurde ein Auslassungsversuch durchgeführt. Dazu wurden zunächst MDCK Δ Gal3-Zellen über 4 h mit rekombinantem Galektin-3 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für verschiedene Zeitintervalle in Abwesenheit von Galektin-3 weiter kultiviert (Abbildung 3.18). Es konnte zunächst ein gradueller Anstieg von Membran-gebundenem hGal3, mit einem Maximum nach vierstündiger Zugabe beobachtet werden. Anschließend sanken die detektierten Galektin-3-Level (3.18A, untere Reihe). Ein ähnliches dynamisches Verhalten wurde für $\beta 1$ -Integrin beobachtet. Der Anteil von an der apikalen Membran isoliertem $\beta 1$ -Integrin stieg mit Zugabe von Galektin-3 und ging nach der Absetzung der Galektin-3-Zugabe wieder zurück (3.18A, obere Reihe und B).

3.5.3. Die Galektin-3-Oligomerisierung ist notwendig für die apikale Sortierung von $\beta 1$ -Integrin

Da viele Funktionen von Galektin-3 auf der Ausbildung von Clustern beruhen (Nabi et al., 2015), sollte in einem nächsten Experiment getestet werden, ob dies auch für die Modulation der Verteilung von $\beta 1$ -Integrin an der Zelloberfläche gilt. Der Galektin-3-Deletionsmutante hGal3C-TRX fehlt die zur effizienten Oligomerisierung notwendige N-terminale Domäne

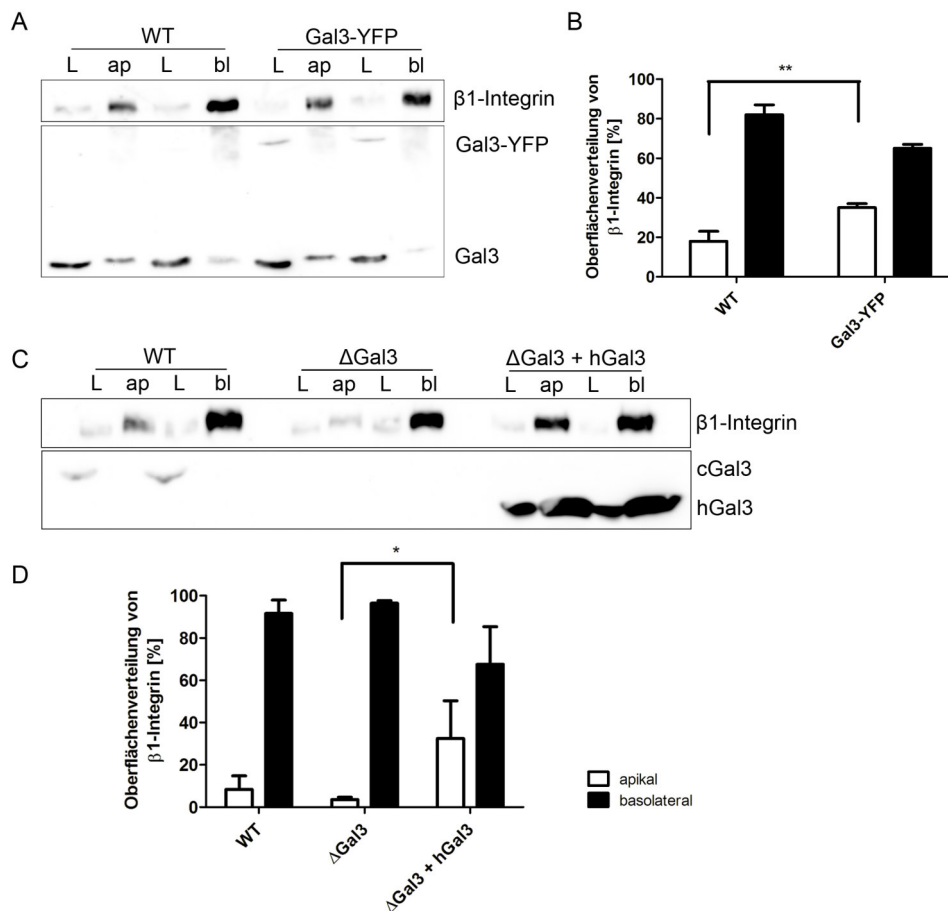


Abbildung 3.16.: Modulation der Oberflächenverteilung von β1-Integrin durch Galektin-3. **A)** Oberflächenbiotinylierung polarer MDCK WT- und Gal3-YFP-Zellen. **B)** Quantifizierung von A. Die β1-Integrin-Level an der jeweiligen Membrandomäne wurden auf die β1-Integrin-Mengen im entsprechenden Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. **C)** Oberflächenbiotinylierung polarer MDCK WT- und ΔGal3-Zellen. In der Rettungskondition (rechts) wurden ΔGal3-Zellen vor der Oberflächenbiotinylierung über 8 h stündlich mit 1.5 μM hGal3 supplementiert. **D)** Quantifizierung von C. Die β1-Integrin-Level an der jeweiligen Membrandomäne wurden auf die α-Tubulin-Mengen (nicht gezeigt) im entsprechenden Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem ungepaarten t-Test. * p < 0.05, ** p < 0.01. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral.

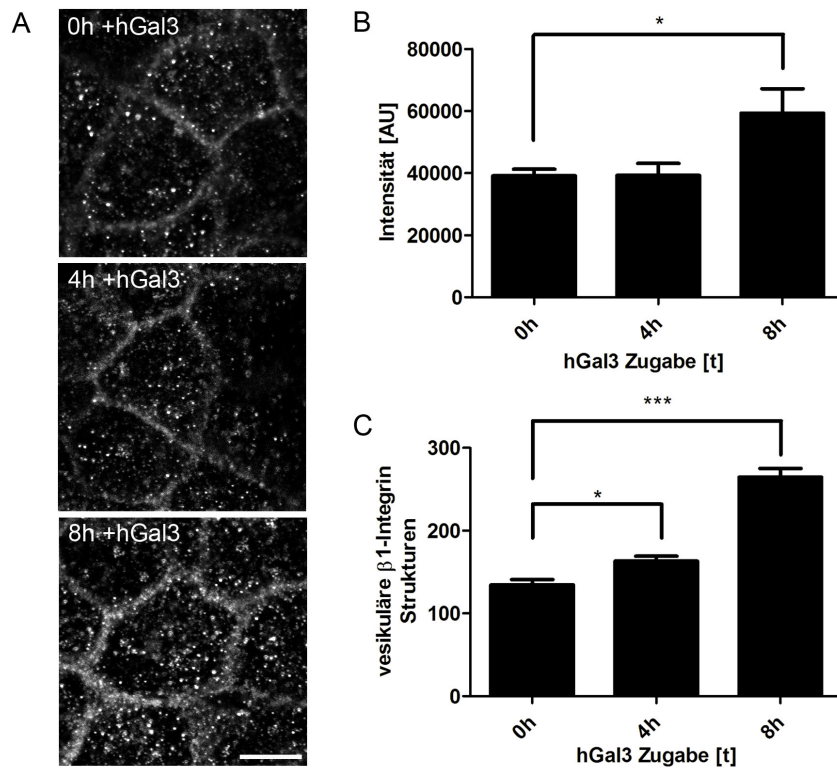


Abbildung 3.17.: Zugabe von Galektin-3 führt zu einer Anreicherung von $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Membran. MDCK Δ Gal3-Zellen wurden über die angegebenen Zeitspannen stündlich mit $1.5 \mu\text{M}$ hGal3 supplementiert. **A)** $\beta 1$ -Integrin (weiß) wurde mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Maßstab $7.5 \mu\text{m}$. **B und C)** Quantifizierung der totalen Fluoreszenzintensitäten der $\beta 1$ -Integrin-Signale (**B**) und der Anzahl von $\beta 1$ -Integrin-positiven vesikulären Strukturen pro Zelle (**C**). Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einer einfaktoriellen ANOVA und Bonferroni-Post-Test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$. Mittelwert + SEM, $n=3$.

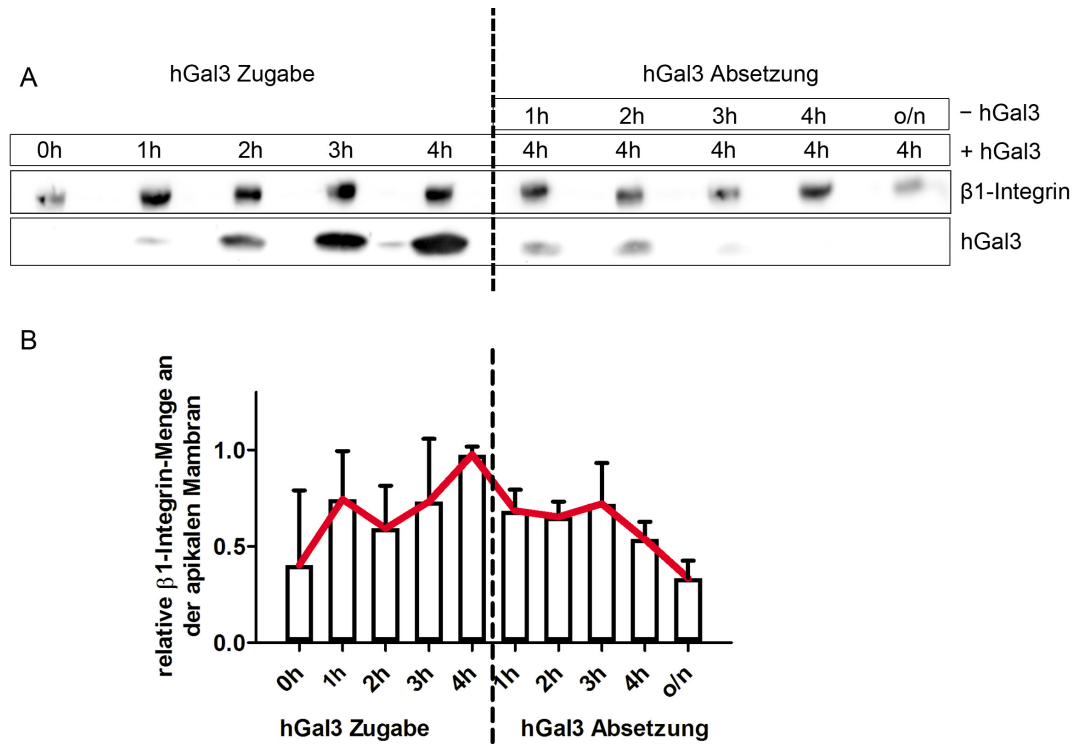
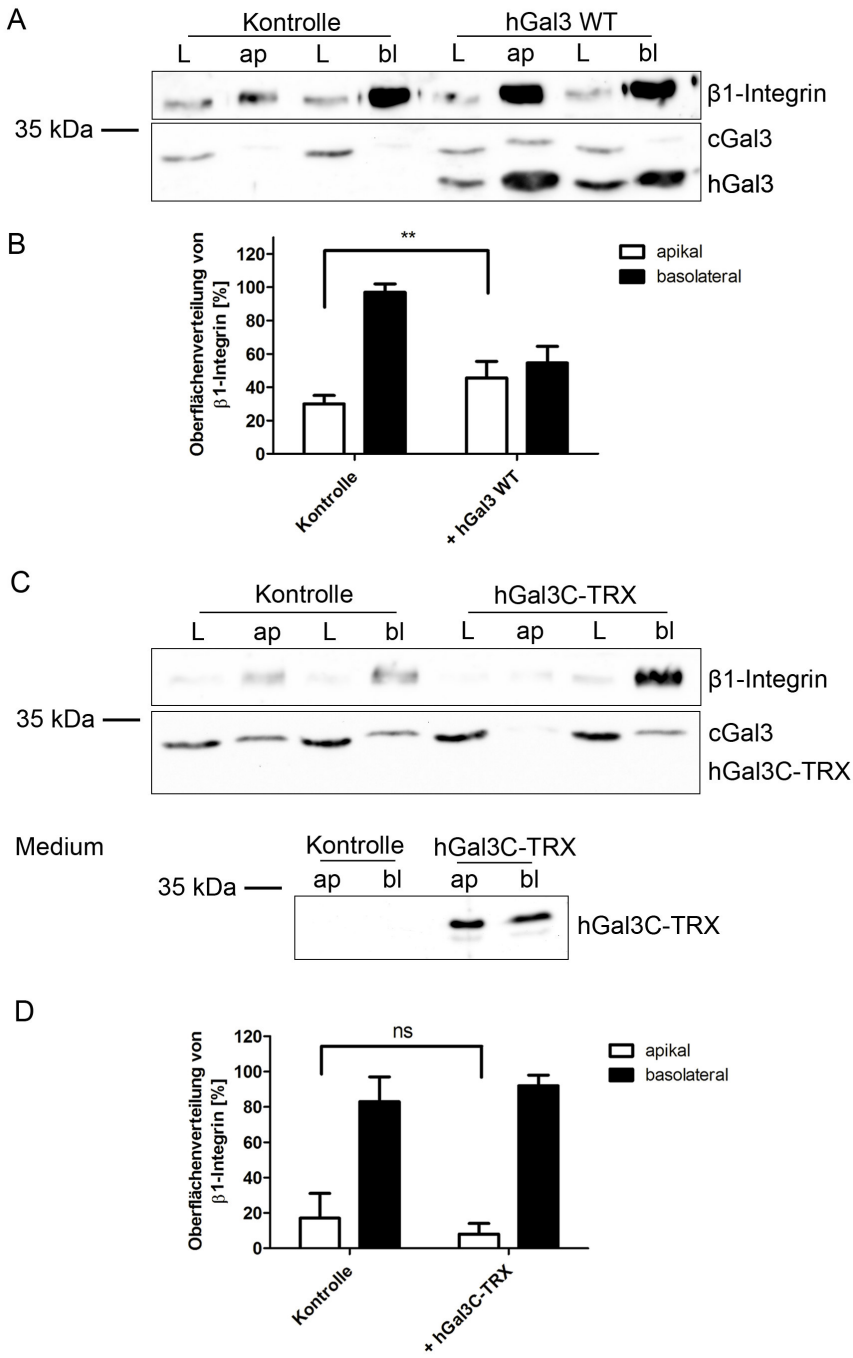


Abbildung 3.18.: Die Anreicherung von apikalem $\beta 1$ -Integrin durch Galektin-3 ist reversibel. A) Polare MDCK Δ Gal3-Zellen wurden für bis zu 4 h stündlich mit $1.5 \mu\text{M}$ hGal3 supplementiert (links der gestrichelten Linie). Nach Galektin-3-Zugabe über 4 h wurden die Zellen für die angegebenen Zeitintervalle unter Abwesenheit des rekombinanten Proteins weiter kultiviert (recht der gestrichelten Linie). Die apikalen Membrandomänen wurden biotinyliert, isoliert und per Westernblot analysiert. **B)** Quantifizierung von A. Die Menge von $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Domäne zu einem Zeitpunkt wurde auf die maximale Menge von $\beta 1$ -Integrin im jeweiligen Experiment normalisiert. Mittelwert + SEM, $n=3$.

(Lepur, Salomonsson et al., 2012), ist aber in der Lage mit der Plasmamembran zu assoziieren (Nieminen et al., 2007; Lepur, Carlsson et al., 2012; Carlsson et al., 2013). MDCK WT-Zellen wurden über 8 h mit hGal3 WT oder hGal3C-TRX inkubiert, bevor die Oberflächenproteine biotinyliert und isoliert wurden. In Abbildung 3.19A und B ist dargestellt, dass auch in WT-Zellen die Zugabe von Galektin-3 eine Umverteilung von β 1-Integrin zur apikalen Domäne hin zur Folge hatte. Jedoch konnte durch die Zugabe von hGal3C-TRX dieses Phänomen nicht beobachtet werden (3.19C und D). Anders als für hGal3 WT (26 kDa) konnte bei dieser Versuchsdurchführung keine Membranassoziation von hGal3C-TRX (27 kDa) detektiert werden (vergleiche untere Reihe in 3.19A und C). In Abbildung 3.19C sind Proben aus den Zellkulturmedien gezeigt, um die erfolgte hGal3C-TRX-Zugabe zu demonstrieren.

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 nicht nur die endogenen Expressionslevel von β 1-Integrin beeinflusst, sondern auch dessen Verteilung an den beiden Membrandomänen von MDCK-Zellen. So wurden in MDCK Δ Gal3-Zellen nur geringe β 1-Integrin-Mengen an der apikalen Membran detektiert. Umgekehrt führten die Überexpression sowie die exogene Zugabe von rekombinantem Galektin-3 zu einer verstärkten apikalen Lokalisation von β 1-Integrin. Die Umverteilung von der basolateralen zur apikalen Domäne unter dem Einfluss von Galektin-3 ist dabei von dessen Oligomerisierung, und damit der Fähigkeit Cluster auszubilden, abhängig.

Abbildung 3.19. (nächste Seite): Modulation der Oberflächenverteilung von β 1-Integrin durch Galektin-3-vermittelte Clusterbildung. A und C) MDCK WT-Zellen wurden über 8 h stündlich mit 1.5 μ M hGal3 WT (A) oder hGal3C-TRX (C) supplementiert. Anschließend wurden Oberflächenproteine der apikalen beziehungsweise basolateralen Membran biotinyliert und isoliert. Die Verteilung von β 1-Integrin an der Zelloberfläche wurde mittels Immunoblot analysiert. In (C) sind zusätzlich Proben der Kulturmedien gezeigt, um die erfolgte hGal3C-TRX-Zugabe zu demonstrieren. B und D) Quantifizierungen von A und C. Die Menge von β 1-Integrin an der jeweiligen Zelloberfläche wurde auf die β 1-Integrin-Menge im entsprechenden Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt. ** p < 0.01, ns = nicht signifikant. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.



3.5.4. Inhibition der Galektin-3-Endozytose depletiert β 1-Integrin von der apikalen Membran

Um der Frage weiter nachzugehen, wie Galektin-3 die Modulation von β 1-Integrin an der Zelloberfläche von MDCK-Zellen bewerkstelligt, wurde als nächstes untersucht, welchen Effekt die Depletion des Lektins aus dem endosomalen System zur Folge hat. Die Endozytose von Galektin-3 erfolgt Clathrin-unabhängig und kann durch Filipin inhibiert werden (Lakshminarayan et al., 2014; Straube et al., 2013). Um die Blockierung der Galektin-3-Endozytose zu verifizieren, wurden MDCK-Zellen über Nacht mit Filipin inkubiert, und am nächsten Tag die Internalisierung des Lektins von der apikalen Membran mittels Konfokalmikroskopie und Westernblot getestet (Abbildung 3.20A und B). Beide Versuche zeigten keine Aufnahme des Lektins in Filipin-behandelten Zellen während einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C. Der Effekt der Endozytose-Inhibierung auf die Verteilung von β 1-Integrin an der Zelloberfläche erfolgte per Oberflächenbiotinylierung (3.20C und D). In Filipin-behandelten MDCK-Zellen wurden stark reduzierte apikale β 1-Integrin-Level beobachtet. Während in Kontrollzellen der apikale Anteil von β 1-Integrin etwa 23 % betrug, belief er sich nach Endozytose-Inhibition auf nur 0.4 %. Der Test auf Internalisierung von rekombinantem Galektin-3 diente als interne Kontrolle und wurde vor der Oberflächenbiotinylierung durchgeführt, um die Blockierung der Galektin-3-Endozytose durch Filipin zu verifizieren. Hierfür wurde die Endozytose von 1.5 μ M Galektin-3 von der apikalen Membran für 30 min bei 37 °C erlaubt. Dabei konnte keine Aufnahme in Filipin-behandelte Zellen detektiert werden.

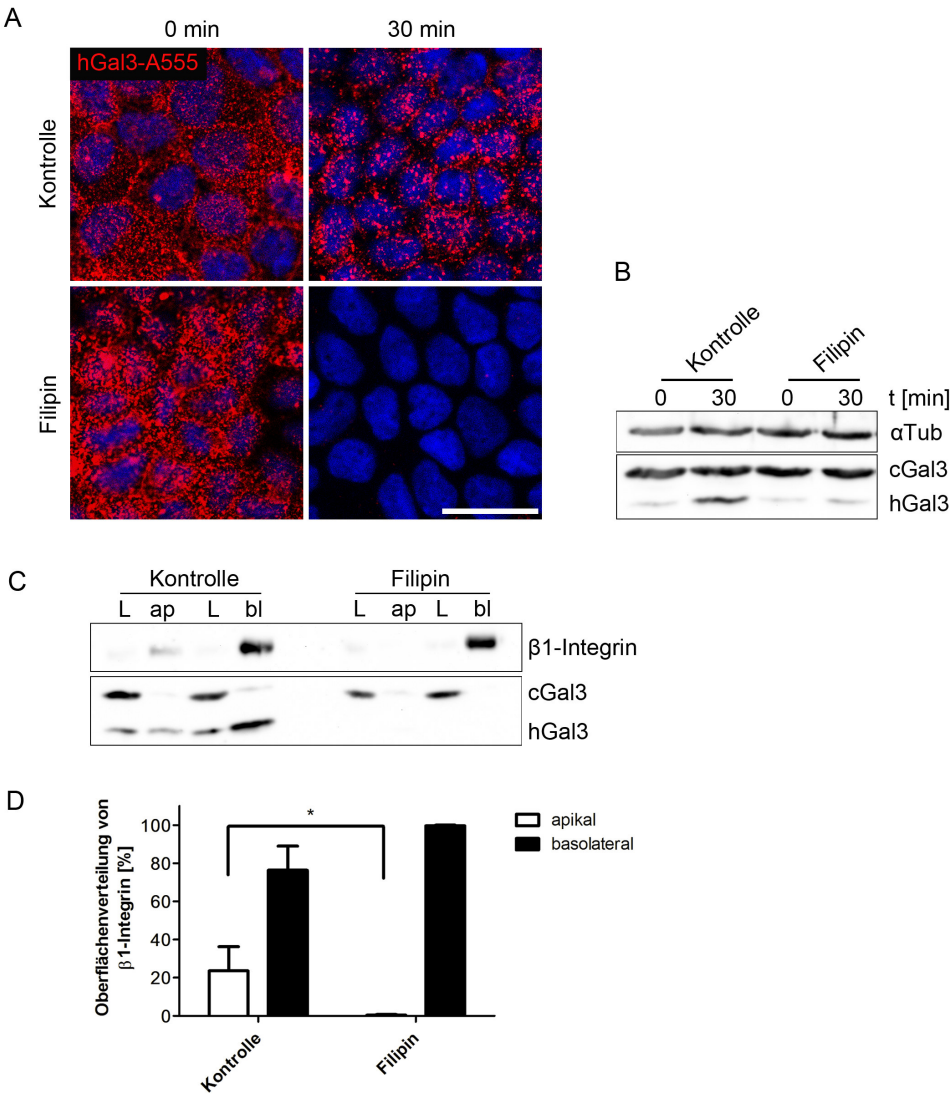
3.5.5. Die Lokalisation von β 1-Integrin ist in der Galektin-3 KO Mausniere nicht beeinträchtigt

Um zu untersuchen, ob Galektin-3 auch die Sortierung von β 1-Integrin *in vivo* beeinflusst, wurden WT und Galektin-3 *Knockout* (KO) Mäusenieren immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Um eine Orientierung im Nierengewebe zu erleichtern, wurde neben β 1-Integrin auch Villin Immunfluoreszenz-markiert (siehe Abbildung 3.21). Villin wird im proximalen

Tubulus stark exprimiert, wo es an der Ausblidung der Mikrovilli an der apikalen Membran beteiligt ist. Proximale Tubuli sind vor allem in der Nierenrinde (*Cortex renalis*) zu finden. Im Nierenmark (*Medulla renalis*) sind dagegen vorwiegend distale Tubuli und Sammelrohre zu finden, die keine Villin-Expression aufweisen. Dies wurde sowohl in WT als auch in Gal3^{-/-} Nieren beobachtet. Die Lokalisation von β 1-Integrin war ebenfalls nicht verändert in den Nieren der Gal3^{-/-} Mäuse. Auch hier war β 1-Integrin vorwiegend basal lokalisiert. Allerdings war zu beobachten, dass β 1-Integrin in der Gal3^{-/-}-Niere vermehrt in vesikulären Strukturen innerhalb der Tubulizellen zu detektieren war. Diese Signale kamen nicht durch eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers (hier AlexaFluor488) zustande, da diese Strukturen in der Negativkontrolle nicht zu sehen waren. Anhand der Negativkontrolle konnte vor allem eine Autofluoreszenz des Gewebes bei Exzitation mit einer Wellenlänge von 543 nm festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente deutlich eine Rolle von Galektin-3 bei der Verteilung von β 1-Integrin an der apikalen und basolateralen Membrandomäne in MDCK-Zellen. Dabei scheinen größere Galektin-3-Mengen die apikale Lokalisation des Integrins zu fördern, wohingegen das Fehlen von Galektin-3 mit geringen apikalen β 1-Integrin-Leveln assoziiert ist.

Abbildung 3.20. (nächste Seite): Oberflächenverteilung von β 1-Integrin bei Inhibition der Galektin-3-Endozytose. MDCK-Zellen wurden über Nacht mit 3 μ M Filipin behandelt, bevor am darauffolgenden Tag die Endozytose von Galektin-3 und die Oberflächenverteilung von β 1-Integrin untersucht wurden. **A und B)** Nach Filipin-Behandlung wurde die Endozytose von 1.5 μ M hGal3-Alexa555 (A) oder hGal3 (B) von der apikalen Membran für 30 min bei 37°C induziert und mittels Konfokalmikroskopie (A) oder Westernblot (B) analysiert. Nicht-internalisiertes Galektin-3 wurde in A) nach 30 min, in B) nach 0 min und 30 min mit 150 mM Laktose entfernt. Maßstab 25 μ m. Jeweils n=1. **C)** Die Oberflächenverteilung von β 1-Integrin bei Endozytose-Inhibition durch Filipin wurde in polaren, auf PET-Filter kultivierten MDCK-Zellen untersucht. Als interne Kontrolle wurde vor der Biotinylierung die Internalisierung von 1.5 μ M hGal3 von der apikalen Membrandomäne für 30 min bei 37°C getestet. **D)** Quantifizierung von C. Die β 1-Integrin-Level an der Membran wurden auf die β 1-Integrin-Mengen im entsprechenden Lysat normalisiert. Mittelwert + SD, n=3. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt. * p < 0.05. L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral.





von jeweils drei Tieren dargestellt. Maßstab 25 μ m.

3.6. Modulation des Transport von neu synthetisiertem β 1-Integrin durch Galektin-3

Es konnte hinreichend demonstriert werden, dass Galektin-3 einen Einfluss auf die Verteilung von β 1-Integrin hat. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob es sich hierbei um eine Umverteilung der vorhandenen β 1-Integrin-Population handelt, oder ob etwa neu synthetisiertes β 1-Integrin im sekretorischen Weg durch Galektin-3 an die apikale Membran sortiert wird. Zunächst sollte die Transportkinetik von β 1-Integrin an die apikale und basolaterale Membran von MDCK WT-Zellen bestimmt werden. Neu synthetisierte Proteine wurden hierfür durch den Einbau der radioaktiven Aminosäure ^{35}S -Methionin markiert. Es folgte eine Inkubation mit unmarkiertem Methionin (*chase*) für verschiedene Zeiten, um den Transport an die Plasmamembran zu erlauben. β 1-Integrin an der Zelloberfläche wurde durch Biotinylierung und Immunpräzipitation isoliert und mittels Radiographie analysiert. Neu synthetisiertes β 1-Integrin konnte bereits 1 h nach *chase* an der apikalen und basolateralen Plasmamembran detektiert werden (Abbildung 3.22). Innerhalb der folgenden 5 h konnte ein stetiger Anstieg der β 1-Integrin-Mengen an der jeweiligen Domäne beobachtet werden.

In einem nächsten Versuch wurde der Effekt von Galektin-3 auf den gerichteten β 1-Integrin-Transport beleuchtet. Dazu wurden die Transportkinetiken in MDCK WT-, MDCK Δ Gal3- und in MDCK Δ Gal3-Zellen die mit Galektin-3 während der *chase*-Periode inkubiert wurden, verglichen (siehe Abbildung 3.23A). Es konnten keine Unterschiede in den Transportraten zur basolateralen Membran in den verschiedenen Zelllinien und Bedingungen beobachtet werden. Jedoch war die Menge an apikal transportiertem β 1-Integrin nach 6 h signifikant erhöht in den mit Galektin-3 inkubierten MDCK Δ Gal3-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Δ Gal3-Zellen (Abbildung 3.23B).

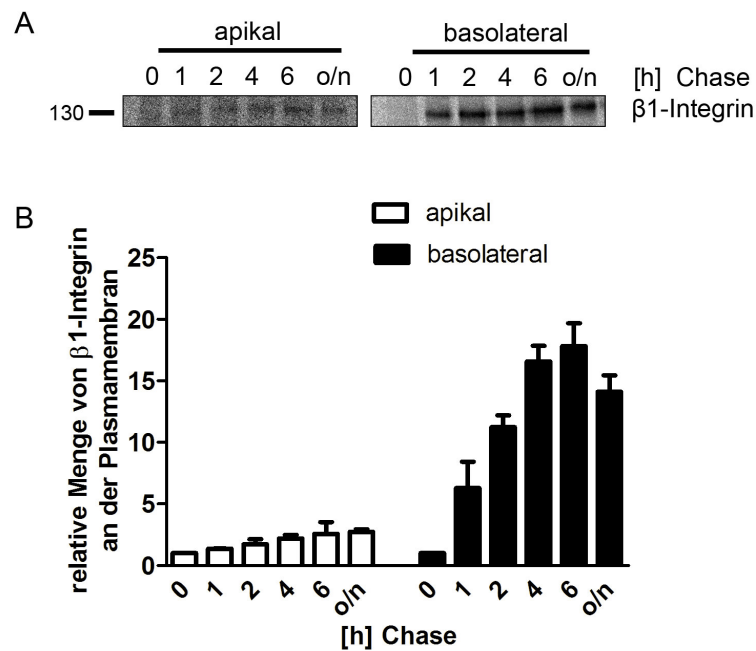


Abbildung 3.22.: Transportkinetik von $\beta 1$ -Integrin. A) MDCK WT-Zellen wurden mit ^{35}S -Methionin metabolisch markiert und für verschiedene Zeitintervalle mit unmarkiertem Methionin weiter inkubiert (*chase*). $\beta 1$ -Integrin wurde von der jeweiligen Membrandomäne durch Oberflächenbiotinylierung und Immunpräzipitation isoliert. Die Menge von neu synthetisiertem $\beta 1$ -Integrin an der Zelloberfläche wurde mittels Radiographie analysiert. B) Quantifizierung von A. Relative Änderung der $\beta 1$ -Integrin-Menge an der apikalen oder basolateralen Membrandomäne (bezogen auf den jeweiligen 0 h-Wert). Mittelwert + SD, n=3. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

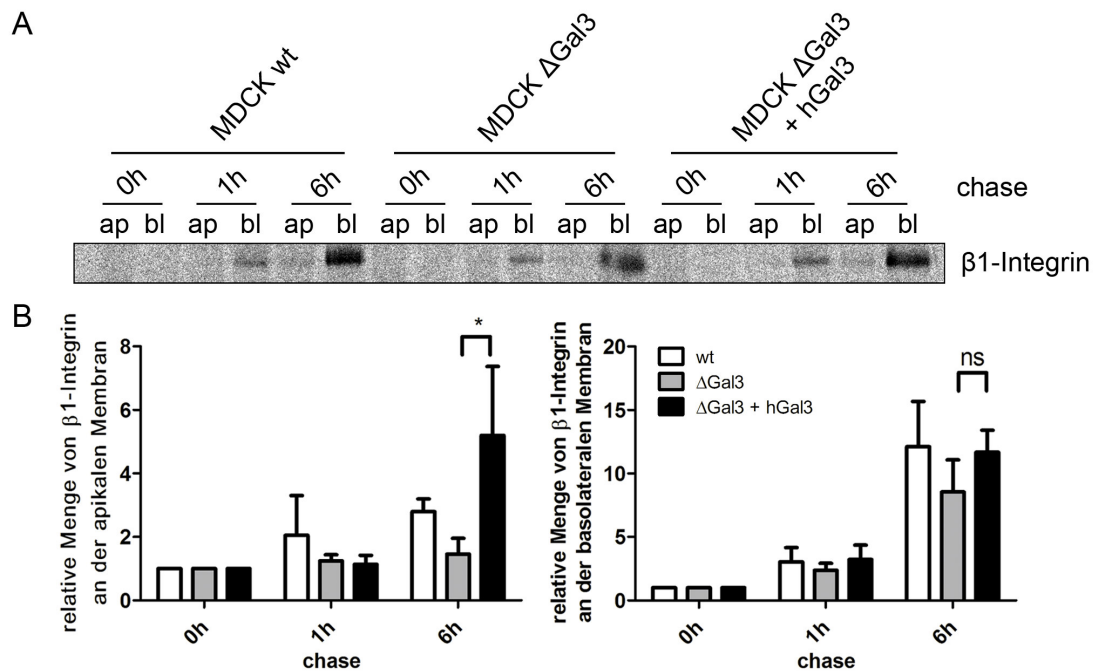


Abbildung 3.23.: Transportkinetik von β 1-Integrin in Abhängigkeit von Galektin-3.

A) MDCK WT- und Δ Gal3-Zellen wurden wie in 3.22 metabolisch markiert und analysiert. Rechts: MDCK Δ Gal3-Zellen wurden während der *pulse*- und *chase*-Perioden mit $1.5 \mu\text{M}$ hGal3 inkubiert. **B)** Quantifizierung von A. Relative Änderung der β 1-Integrin-Menge an der apikalen (links) oder basolateralen (rechts) Membrandomäne (bezogen auf den jeweiligen 0 h-Wert). Mittelwert + SD, n=3. Die statistische Signifikanz wurde für die 6 h-Werte mittels einer einfaktoriellen ANOVA und Bonferroni-Post-Test ermittelt. * p < 0.05, ns = nicht signifikant.

Diese Daten lassen vermuten, dass β 1-Integrin nach Neusynthese direkt an beide Membrandomänen transportiert wird und nicht etwa über Transzytose an eine der beiden Domänen gelangt. Dabei kann exogenes Galektin-3 den apikalen Transport von β 1-Integrin verstärken und scheint für dessen apikale Sortierung verantwortlich zu sein.

3.7. Endozytose von Galektin-3 und β 1-Integrin

Nachdem durch die vorausgegangenen Experimente gezeigt werden konnte, dass Galektin-3 die Oberflächenverteilung sowie den apikalen Transport von neu synthetisiertem β 1-Integrin beeinflusst, sollte nun untersucht werden, ob das Lektin auch einen Einfluss auf die Endozytose von β 1-Integrin hat.

3.7.1. Die Endozytose von Galektin-3 erfolgt über die apikale Domäne

Zuerst sollte untersucht werden, ob neben der Sekretion und der Membranbindung, auch die Endozytose von Galektin-3 polar ist. Dazu wurden die apikalen oder basolateralen Domänen von auf PET-Filtern kultivierten MDCK-Zellen mit Alexa-markiertem Galektin-3 versetzt und die Endozytose für insgesamt 30 min erlaubt. Hierbei ist anzumerken, dass nicht internalisierte Proteine bereits nach 10 min mit 0.2 % Essigsäure entfernt wurden. Die Zellen wurden anschließend fixiert und mit Hilfe des KLSM analysiert (Abbildung 3.24A). In Zellen deren apikale Membran mit Galektin-3 inkubiert wurde, konnte das Lektin in zahlreichen intrazellulären, vesikulären Strukturen beobachtet werden. Wurde Galektin-3 von der basolateralen Seite zugegeben, konnten nur unspezifische Signale detektiert werden. Um sicherzustellen, dass in diesem Versuchsaufbau die Endozytose von der basolateralen Domäne nicht beeinträchtigt ist, wurde zur Kontrolle die Aufnahme von Transferrin-Alexa555 (Tf-Alexa555) untersucht. Dieses Protein wurde im Gegensatz zu Galektin-3 ausschließlich von der basolateralen Plasmamembran internalisiert. Um die apikale Endozytose von Galektin-3 mit einer weiteren Methode zu demonstrieren, wurde die Aufnahme des Lektins mittels Westernblot untersucht (Abbildung 3.24B). Die apikalen beziehungsweise basolateralen Überstände polarer MDCK-Zellen wurden mit rekombinantem Galektin-3 versetzt und die Internalisierung für die angegebenen Zeitspannen induziert. In diesem Versuch wurde nicht aufgenomme-

nes Lektin direkt vor der Zelllyse durch Waschen mit 150 mM Laktose entfernt. Bereits nach 10 min konnte apikal appliziertes Galektin-3 intrazellulär nachgewiesen werden. Zellen deren basolaterale Domäne mit dem Lektin inkubiert wurden zeigten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Aufnahme des Proteins.

3.7.2. Galektin 3 und β 1-Integrin werden gemeinsam endozytiert

In polaren MDCK-Zellen wurde untersucht, ob die Endozytose von Galektin-3 und β 1-Integrin an der apikalen Membran gemeinsam stattfindet. Hierfür wurde biotinyliertes Galektin-3, unter Anwesenheit des Crosslinkers DSP zur Stabilisation potentieller Protein-Protein-Interaktionen zu polaren MDCK-Zellen gegeben und die Endozytose bei 37 °C erlaubt. Nach 10 min wurden die Zellen auf Eis gehalten, nicht-internalisiertes Galektin-3 mit Laktose entfernt und anschließend bei 37 °C weiter kultiviert, um die Endozytose fortzusetzen. Biotinyliertes Galektin-3 wurde nach Lyse der Zellen mit Hilfe von Neutravidin-*beads* isoliert. In der Westernblot-Analyse konnte eine gemeinsame Internalisierung von hGal3-Biotin und β 1-Integrin aufgezeigt werden (Abbildung 3.25A). Die Menge von hGal3-Biotin-assoziiertem β 1-Integrin zeigte ein Minimum zwischen 20 und 40 min nach Endozytoseinduktion und stieg zu späteren Zeitpunkten wieder an.

3.7.3. Die β 1-Integrin-Endozytose ist nicht durch Laktose inhibierbar

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Co-Endozytose von Galektin-3 und β 1-Integrin von der Glykan-Bindefunktion des Lektins abhängig ist. Daher wurde die Endozytose von β 1-Integrin an der apikalen Membran unter Anwesenheit von Laktose untersucht. Die Endozytose von Membran-assoziierten Proteinen kann mit Hilfe von reduzierbarem Biotin untersucht werden. Dazu werden zunächst die Oberflächenproteine mit membranimpermeablem NHS-SS-Biotin markiert. Internalisierte Proteine liegen nach der Endozytose im Zellinneren vor. Damit sind die Disulfidbrücken der mit NHS-SS-Biotin mar-

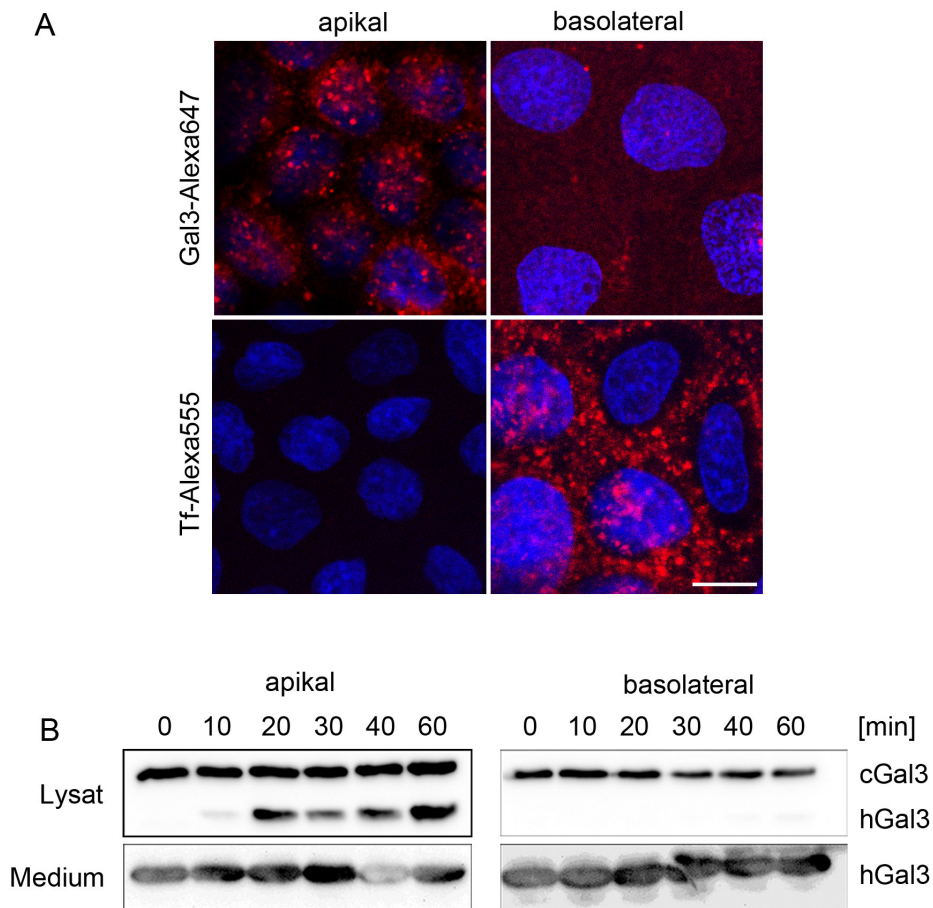


Abbildung 3.24.: Endozytose von Galektin-3 in MDCK-Zellen. **A)** Die apikalen und basolateralen Domänen von auf PET-Filtern kultivierten MDCK-Zellen wurden mit Alexa-markiertem Galektin-3 oder Transferrin (rot) für 30 min bei 37°C inkubiert. 10 min nach Induktion der Endozytose wurden die Zellen mit 0.2% Essigsäure gewaschen, um nicht internalisierte Proteine von den Zelloberflächen zu entfernen. Zellkerne sind in blau dargestellt. n=1. Maßstab 7.5 µm. **B)** Das apikale oder basolaterale Medium polarer MDCK-Zellen wurde mit 5 µM rekombinantem hGal3 versetzt. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeitspannen bei 37°C inkubiert, um die Endozytose zu erlauben. Nicht aufgenommenes hGal3 wurde mit 150 mM Laktose abgewaschen. Die Zellen wurden lysiert und per Westernblot analysiert. n=4.

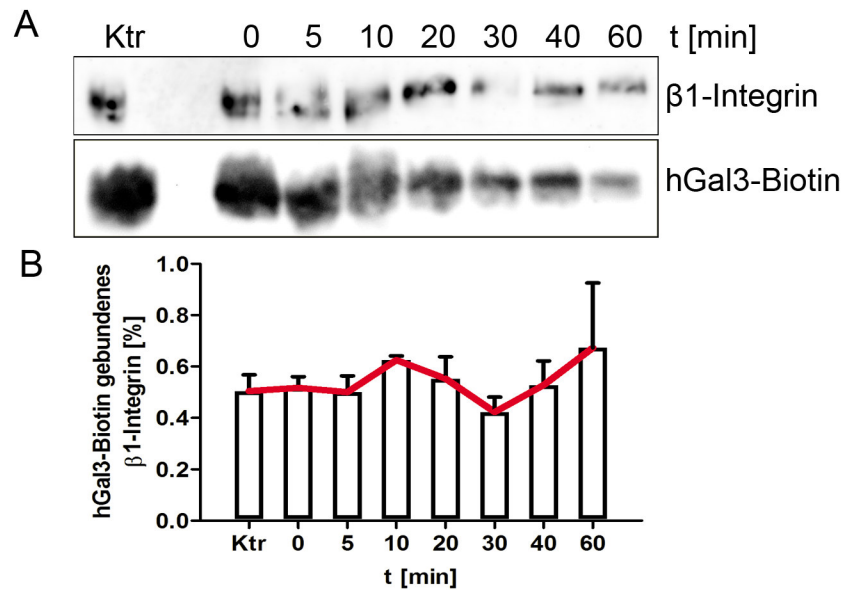


Abbildung 3.25.: Co-Endozytose von Galektin-3 und β 1-Integrin. A) Biotinyliertes Galektin-3 wurde ins apikale Medium polarer MDCK-Zellen gegeben und die Endozytose unter Anwesenheit von DSP für 10 min induziert (Ktr). Nach Abwaschen von nicht-internalisiertem Lektin mit Laktose, wurde die Endozytose für die angegebenen Zeitintervalle fortgesetzt. Aufgenommenes hGal3-Biotin wurde isoliert und co-präzipierende Proteine wurden per Westernblot analysiert. B) Quantifizierung von A. Detektierte β 1-Integrin-Mengen wurden auf die isolierten hGal3-Biotin-Level normalisiert. Mittelwert und SEM, n=4. Ktr = Kontrolle.

kierten Proteine vor einer nachfolgenden Reduktion mit Glutathion geschützt, wohingegen die Markierung von nicht aufgenommenen Proteinen so entfernt wird. Für die Durchführung dieses Versuches wurden MDCK Gal3-YFP-Zellen herangezogen, da diese höhere apikale β 1-Integrin-Mengen aufweisen. Die Endozytose wurde unter An- und Abwesenheit von 50 mM Laktose für 30 min bei 37 °C erlaubt. In Abbildung 3.26A ist zu sehen, dass unter beiden Bedingungen β 1-Integrin nach 30 min zu größeren Mengen als zu Versuchsbeginn (nach 0 min) aus dem Lysat isoliert werden konnte. Es ist zu beachten, dass auch beim Nullwert β 1-Integrin detektiert werden konnte, obwohl hier keine Endozytose initiiert wurde. Dies wurde bei der Quantifizierung berücksichtigt, indem die beim Nullwert detektierte β 1-Integrin-Menge vom 30 min-Wert subtrahiert wurde (Abbildung 3.26B). Es konnte bei diesem Versuch kein wesentlicher Einfluss von Laktose auf die Effizienz der β 1-Integrin-Endozytose an der apikalen Membran festgestellt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Galektin-3 und β 1-Integrin gemeinsam an der apikalen Membran aufgenommen werden und nach Internalisierung zusammen co-präzipitieren. Jedoch ist die Endozytose von β 1-Integrin nicht durch Laktose inhibierbar und scheint daher nicht von der Zucker-Bindefunktion von Galektin-3 abhängig zu sein.

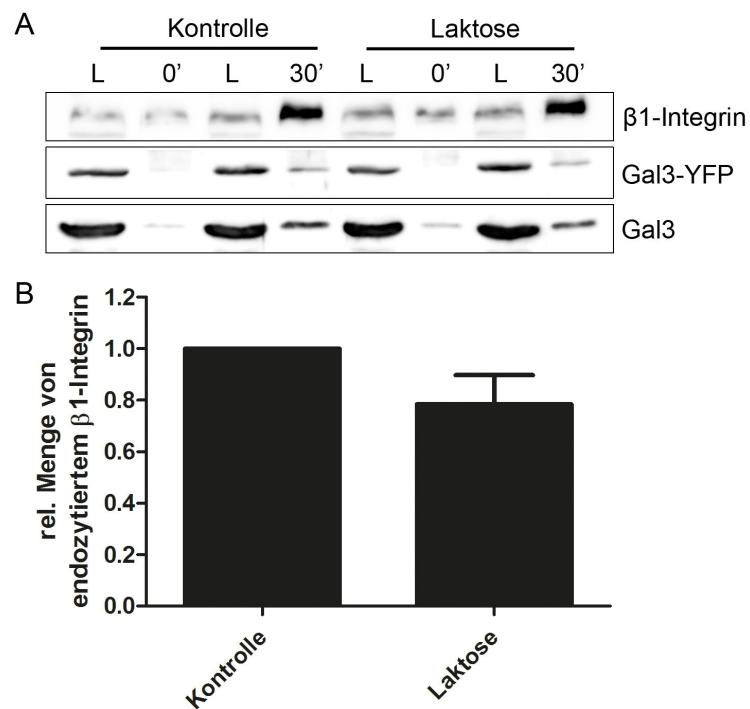


Abbildung 3.26.: Endozytose von $\beta 1$ -Integrin unter Anwesenheit von Laktose. **A)** Die Internalisierung von $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Membrandomäne wurde in polaren MDCK Gal3-YFP-Zellen unter An- und Abwesenheit von Laktose mit Hilfe von reduzierbarem Biotin untersucht. Die Endozytose wurde für 30 min erlaubt und aufgenommene, biotinylierte Proteine mit Neutravidin-beads isoliert und mittels Immunoblot analysiert. **B)** Quantifizierung von A. Detektierte $\beta 1$ -Integrin-Mengen wurden auf die entsprechenden Level im Lysat normalisiert. Dargestellt sind die Nullwert-bereinigten $\beta 1$ -Integrin-Mengen nach 30 min Endozytose, normalisiert auf die Kontrollbedingung. Mittelwert und SD, n=3.

4. Diskussion

4.1. Polare Verteilung von Galektin-3 und Interaktion mit $\beta 1$ -Integrin in Epithelzellen

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten MDCK-Zellen, polare Epithelzellen der Niere, sekretieren das Galaktose-bindende Protein Galektin-3 vornehmlich an der apikalen Plasmamembran (siehe Abbildung 3.1). Durch diese Beobachtung können Erkenntnisse aus früheren Studien von Lindstedt et al. (1993) bestätigt werden und es ergibt sich die interessante Fragestellung, warum das Lektin in MDCK-Monolayern bevorzugt an dieser Membrandomäne sekretiert wird.

Extrazelluläres Galektin-3 reguliert vielfältige zelluläre Prozesse durch die Ausbildung von Galektin-Glykoprotein-Netzwerken („Galektin-3-Cluster“). So entstehen durch Quervernetzung von Glykoliganden Membranmikrodomänen, die beispielsweise die Rekrutierung von Membranrezeptoren erleichtern und nachfolgend intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen (Nabi et al., 2015). Die Quervernetzung von Glykoproteinliganden in der Membran durch Galektin-3 stellt dabei eine Phasentrennung von löslichen Komplexen in ein gelartiges Polymer dar (Ahmad et al., 2004; Li et al., 2012). Die Grundvoraussetzung für die Ausbildung dieser Galektin-3-Cluster ist die Bindung des Lektins an die Plasmamembran. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Bindung von Galektin-3 an beiden Membrandomänen stattfindet oder ebenfalls bevorzugt an der apikalen Domäne erfolgt. Mittels Biotinylierung von Oberflächenproteinen konnte gezeigt werden, dass endogenes Galektin-3

Membran-assoziiert ist und außerdem per se in der Lage ist, gleichermaßen an die apikale wie an die basolaterale Plasmamembran zu binden (Abbildung 3.2A). Größere Cluster von exogen zugegebenem rekombinanten Galektin-3-Biotin wurden jedoch ausschließlich an der apikalen Membran detektiert (Abbildung 3.2B). Auch wenn die im Experiment eingesetzten Galektin-3-Mengen die physiologischen Konzentrationen um ein Vielfaches übersteigen (vergleiche A.1.1), war die Ausbildung dieser Galektin-3-Cluster nicht alleine der vergleichsweise hohen Konzentration des rekombinanten Lektins geschuldet. Durch die Untersuchung der Bindung von größeren Mengen rekombinanten Galektin-3 an die Proteinkomponente der Plasmamembran konnte eine Assoziation des Lektins mit Proteinen der apikalen sowie der basolateralen Membran beobachtet werden (Abbildung 3.2C). Vielmehr zeigen diese Ergebnisse, dass die Ausbildung der Galektin-3-Cluster an der apikalen Membran nicht allein durch Glykoproteine vermittelt wird, sondern dass auch andere Membrankomponenten, wie Glykolipide beteiligt sind. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Glykosphingolipide (GSL), da Galektin-3 an GSLs bindet (Collins et al., 2014) und das äußere Blatt der apikalen Plasmamembran in Epithelzellen mit GSLs angereichert ist (van Meer et al., 1987). Desweiteren wurde gezeigt, dass eine Depletion von GSLs eine Verminderung der Galektin-3-Clusterbildung an der Membran zur Folge hat (Lakshminarayan et al., 2014).

Als proteinogene Interaktionspartner für Galektin-3 an der apikalen Membran wurden Vertreter der Integrin-Familie (α 2- und β 1-Integrin) identifiziert (siehe Abbildungen 3.3 und 3.5). Dabei ist anzumerken, dass die hier gezeigte Interaktion nicht zwangsläufig direkt stattfindet. Sowohl die Co-Immunopräzipitationsexperimente, als auch die Versuche mit biotinyliertem Galektin-3 schließen die Beteiligung weiterer Komponenten für die Galektin-3-Integrin-Assoziation nicht aus. Desweiteren werden Integrine in der Zelle stets als Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, exprimiert. Vertreter beider Untereinheiten wurden per Co-Immunopräzipitation (α 2- und β 1-Integrin) und massenspektrometrisch (α 2- und α 3-Integrin) als Interaktionspartner für Galektin-3 ermittelt. Anhand dieser Daten lässt sich nicht ableiten, mit welcher der beiden Untereinheiten Galektin-3 interagiert. Jedoch konnten mit Antikörpern, die gegen die extrazelluläre Domäne von β 1-Integrin gerichtet sind, einige durch extrazelluläres Galektin-3-vermittelte Effekte wie die Induk-

tion der Apoptose (Zhuo et al., 2008) und die Adhäsion an die Extrazelluläre Matrix (EZM) (Friedrichs et al., 2008) inhibiert werden. Diese Erkenntnisse deuten auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine hin.

Integrine sind in MDCK-Zellen sowie in den Nierentubuli der Maus vorwiegend basolateral lokalisiert (siehe Abbildungen 3.7 und 3.9). Da sie als Bestandteil von Fokalen Adhäsionen Zell-Matrix-Kontakte herstellen, entspricht diese Beobachtung dem in der Literatur verbreiteten Bild (Lee & Streuli, 2014). Dennoch sind in MDCK Monolayern etwa 30 % des gesamten $\beta 1$ -Integrin an der Zelloberfläche an der apikalen Domäne lokalisiert und co-lokalisieren dort mit endogenem und exogen zugegebenem Galektin-3 (siehe 3.7 und 3.8). Während von Schoenenberger et al. (1994) $\beta 1$ -Integrin nur an der basalen und lateralen Membran in MDCK-Zellen detektiert werden konnte, zeigten auch Zuk und Matlin (1996) eine apikale Lokalisation von $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 3\beta 1$ -Integrin und deckten ihre Rolle bei der Tubulogenese der Zellen bei Kultivierung in Kollagengelen auf. Auch Akhtar und Streuli (2013) beschrieben eine Funktion von $\beta 1$ -Integrin bei der Bestimmung der Lokalisation der apikalen Lumenausbildung in einer Brustzelllinie. Hierbei wird $\beta 1$ -Integrin an die neobasolaterale (ehemals apikale) Membran mobilisiert und rekrutiert wiederum mit Hilfe der ILK (*integrin linked kinase*) Mikrotubuli-Plusenden und bestimmt so die neue Ausrichtung der Zelle. Apikal lokalisierte Integrine wurden auch in einer Reihe anderer Epithelzellen beschrieben und führen dort verschiedene Aufgaben aus. Beispielsweise ist apikales $\alpha v\beta 5$ -Integrin in RPE-Zellen an der Erneuerung der Außensegmente von Photorezeptoren und damit für den Erhalt der Sehkraft verantwortlich (Finnemann et al., 1997; Finnemann & Silverstein, 2001; Nandrot et al., 2012). In Endothelzellen aktiviert apikal exprimiertes $\beta 1$ -Integrin bei akut erhöhten Scherkräften eine Signalkaskade, die über die Aktivierung der NO-Synthase zur Vasodilatation führt (Yang & Rizzo, 2013). Apikal lokalisierte Integrine können also je nach Zelltyp und Gewebe verschiedenen Funktionen wie zum Beispiel dem Aufbau der epithelialen Polarität, der Homöostase durch Phagozytose oder der Mechanotransduktion dienen.

Bezüglich der polaren Sekretion von Galektin-3 ist anzumerken, dass in polaren MDCK-Monolayern die Sekretion fast ausschließlich an der apikalen Membran stattfindet (Abbildung 3.1 und Lindstedt et al., 1993). Werden jedoch MDCK-Zellen in Kollagengelen

kultiviert, bilden sie Zysten aus und Galektin-3 wird dann vornehmlich an der basolateralen Membran sekretiert Bao und Hughes (1995). Demnach ist die Polarität der Sekretion von Galektin-3 in MDCK-Zellen stark von deren Morphologie abhängig und kann durch die Funktion von extrazellulärem Galektin-3 erklärt werden, die Zell-Zell- und die Zell-Matrix-Adhäsion zu modulieren (Hughes, 1999). Dabei wird das Lektin in Monolayern und Zysten mit unterschiedlichen Anforderungen konfrontiert. Während des Zystenwachstums findet eine starke Zellproliferation statt und so müssen die Zellkontakte ständig ab- und wieder aufgebaut werden, um die Mitose und die Trennung der Tochterzellen zu ermöglichen. Dagegen sind die Zellen in konfluenten Monolayern quieszent und die Zellpolarität ist etabliert. Basolaterales Galektin-3 wird für den Auf- und Abbau der Zellkontakte hier möglicherweise nicht mehr benötigt (Hughes, 1999).

Außerdem wurde Galektin-3 auch im Zusammenhang mit Integrinen häufig als Regulator der Zelladhäsion beschrieben. Während die Abwesenheit des Lektins oder geringe Konzentrationen die Zelladhäsion erhöhen, haben hohe Galektin-3-Konzentrationen den gegenteiligen Effekt und inhibieren die Zelladhäsion an die EZM (Ochieng et al., 1998; Furtak et al., 2001; Friedrichs et al., 2008; Priglinger et al., 2013). Dabei bindet Galektin-3 präferentiell stark verzweigte, Mgat5-modifizierte *N*-Glykane (Dennis & Brewer, 2013). Mgat5 ist an der Verzweigung von *N*-Glykanen beteiligt (ein sogenanntes *branching*-Enzym) und führt durch Erweiterung von *N*-Glykan-Intermediaten im Golgi-Apparat zur Ausbildung von tri- und tetraantennären Zuckerketten. Durch die Interaktion mit solchen Mgat5-modifizierten *N*-Glykanen fördert Galektin-3 über eine β 1-Integrin-Signalkaskade die Ausbildung Fokaler Adhäsionen und die Zellmigration (Lagana et al., 2006; Boscher & Nabi, 2013). Dabei ist anzumerken, dass diese Erkenntnisse zur Modulation der Zelladhäsion durch Galektin-3 mit Hilfe von Tumorzelllinien, dedifferenzierten Zellen oder unpolaren MDCK-Zellen gewonnen wurden. Interessanterweise wird Galektin-3, das die Zelladhäsion vermindert, in einigen Tumoren überexprimiert (Nabi et al., 2015). Desweiteren ist eine Mgat5-Überexpression mit der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und einem invasiven Phänotyp assoziiert (Partridge et al., 2004). Demnach scheint eine hohe Mgat5-Aktivität zusammen mit erhöhten Galektin-3-Leveln zu einer Verringerung der Zelladhäsion zu führen und damit die Zellmi-

gration zu fördern. Die Funktion der Galektin-3- β 1-Integrin-Interaktion ist also vorwiegend in nicht-epithelialen Zellen beschrieben. Die Rolle dieser Interaktion an der apikalen Membrandomäne in polaren MDCK-Zellen ist bisher nicht charakterisiert.

4.2. Glykosylierung von β 1-Integrin

Aufgrund der Beobachtung, dass Galektin-3 hauptsächlich an apikal lokalisierte Integrine bindet, obwohl diese vorwiegend basolateral lokalisiert sind, stellte sich die Frage, worin sich diese beiden Integrin-Populationen unterscheiden. Die Bindung des Lektins an die Plasmamembran sowie die Co-Präzipitation von β 1-Integrin scheint über Glykanmodifikationen vermittelt zu sein, da sie durch Laktose inhibiert werden konnten (Abbildung 3.6). Daher war es nahe liegend, das Glykosylierungsmuster von β 1-Integrin zu analysieren und zu untersuchen, ob es dabei Unterschiede zwischen den apikal und basolateral exprimierten Populationen gibt.

Zunächst soll die *N*-Glykosylierung von β 1-Integrin näher betrachtet werden. Erste Hinweise auf die Rolle der *N*-Glykane bei der Vermittlung der Galektin-3- β 1-Integrin-Bindung lieferten Studien mit Mgat5-depletierten Mäusen und Zelllinien. Das Fehlen von tri- und tetraantennären *N*-Glykan-Modifikationen durch eine Depletion von Mgat5 hat eine verminderte Galektin-3-Bindung zur Folge (Dennis et al., 2002; Lagana et al., 2006; Saravanan et al., 2009).

Zur Untersuchung der *N*-Glykosylierung von apikal und basolateral exprimierten β 1-Integrinen wurden hier Membranproteine von der jeweiligen Domäne durch Oberflächenbiotinylierung isoliert, mit Glykosidasen behandelt und anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Glykosidase-Sensitivität zeigt sich aufgrund der Abspaltung der Zuckerketten durch eine erhöhte Migration im Gel und kann per Westernblot analysiert werden. Komplex *N*-glykosylierte Kohlenhydratseitenketten können von Peptid:*N*-Glykosidase F (PNGase F)

und mannosereiche *N*-Glykosylierungen von Endoglykosidase H (Endo H) gespalten werden (Freeze, 2001). Apikale sowie basolaterale β 1-Integrine zeigten keine Sensitivität gegenüber Endo H, wohingegen die Behandlung mit PNGase F eine Reduktion des Molekulargewichts von 130 kDa auf etwa 100 kDa zur Folge hatte (Abbildung 3.11). Demzufolge tragen apikal und basolateral lokalisierte β 1-Integrine komplex glykosylierte *N*-Glykane. Die stark beeinträchtigte Galektin-3-Bindung an basolaterales β 1-Integrin kann also nicht etwa durch *N*-Glykosylierungen des *high mannose*-Typ erklärt werden.

Komplex glykosylierte *N*-Glykane werden typischerweise von einer *N*-Acetylneuraminsäure (im Folgenden „Sialinsäure“ genannt) terminiert (Freeze, 2001). In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass sowohl apikal als auch basolateral exprimierte β 1-Integrine Neuraminidase-sensitiv sind und folglich terminale Sialinsäuren tragen (siehe 3.11). Nun scheint die Art und Weise der Verknüpfung der Sialinsäure an die darunter liegende *N*-Acetyllaktosamin (LacNAc)-Einheit eine entscheidende Rolle bei der Erkennung durch Galektin-3 zu spielen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass verschiedene Zuckerkonfigurationen einen lokalen Effekt auf die Proteinstruktur haben und die Zugänglichkeit zur Galektin-Bindestelle verändern können (Holíková et al., 2002). Dabei beeinträchtigt eine α 2,6-glykosidische Verknüpfung die Bindung von Galektin-3, wohingegen α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren eine Bindung des Lektins erlauben (Elola et al., 2015). Das Lektin SNA erkennt α 2,6- aber nicht α 2,3-glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren, und kann daher zur Untersuchung herangezogen werden, ob die basolaterale Spezies, die nicht von Galektin-3 gebunden wird, vermehrt α 2,6-verknüpften Sialinsäuren trägt. Die Assoziation von SNA mit apikalem β 1-Integrin in MDCK-Zellen wurde bereits von Praetorius et al. (2001) gezeigt. Allerdings wurde in dieser Studie nicht die basolaterale β 1-Integrin-Population untersucht. Dieser Vergleich sollte daher in dieser Arbeit vorgenommen werden. Wie Galektin-3, präzipitierte auch SNA β 1-Integrin von der apikalen, aber nicht von der basolateralen Membran (Abbildung 3.12). Die verminderte Bindung von Galektin-3 an basolaterales β 1-Integrin kann also auch nicht durch eine verstärkte α 2,6-Sialylierung erklärt werden. Vielmehr stellt sich die Frage, wie Galektin-3 apikales, α 2,6-sialyliertes β 1-Integrin bindet. Möglicherweise sind nicht alle LacNAc-Reste mit Sialinsäuren dekoriert, oder aber sie sind in anderer Weise (α 2,3-

glykosidisch) verknüpft. Dies soll in weiter führenden Studien mit Hilfe eines weiteren Lektins ermittelt werden. Dafür soll *Maackia amurensis* Leukoagglutinin (MAL) eingesetzt werden, welches α 2,3-glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren an *N*-Glykanen erkennt (Geisler & Jarvis, 2011).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Beteiligung von *O*-Glykanen auf β 1-Integrin bei der Bindung von Galektin-3. Ein Zusammenhang von *O*-Glykosylierungen und Galektin-3-vermittelter Sortierung wurde für den apikalen Transport von p75^{NTR} beobachtet. So sind sowohl die *O*-Glykanmodifikation als auch das Vorhandensein des Lektins unabdingbar für den korrekten Transport des Proteins (Yeaman et al., 1997; Delacour, Greb et al., 2007). In einer glykoproteomischen Studie wurden kürzlich mehrere *O*-Glykosylierungsstellen an β 1-Integrin identifiziert. Davon ist mindestens eine (T394) für humanes β 1-Integrin verifiziert (Steentoft et al., 2013). Die Behandlung mit *O*-Glykosidase zeigte jedoch weder für apikales noch für basolaterales β 1-Integrin eine Veränderung im Migrationsverhalten bei der SDS-PAGE (Abbildung 3.11). Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass *O*-Glykane je nach Glykosylierung (Art und Anzahl der Zuckerreste) nur etwa 400 bis 800 Da groß sind. So kann die Veränderung im Migrationsverhalten nach Behandlung mit *O*-Glykosidase nur schwer detektiert werden und wurde somit möglicherweise in diesem Experiment nicht erfasst.

Eine weitere Methode um das Vorhandensein von *O*-Glykosylierungen auf β 1-Integrin zu untersuchen beinhaltet die Verwendung von *Peanut agglutinin* (PNA), welches *O*-Gal β 1,3GalNAc erkennt. Eine Co-Präzipitation von β 1-Integrin mit PNA nach vorheriger Neuraminidase-Behandlung zur Entfernung von terminalen Sialinsäuren würde für das Vorhandensein von *O*-Glykanen sprechen. In einer humanen Leberzellkarzinom-Zelllinie (HCC36) konnte eine solche Interaktion bereits gezeigt werden (Liu et al., 2014). Um dann anschließend zu testen, ob die terminale Sialinsäure an *O*-glykosyliertem β 1-Integrin über eine α 2,3-glykosidische Bindung vermittelt wird, kann in weiteren Versuchen das Lektin *Maackia amurensis* Hämagglutinin (MAH) eingesetzt werden, das α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren an *O*-Glykanen erkennt (Geisler & Jarvis, 2011).

Um die Frage abschließend zu klären, ob die Galektin-3-Bindung an β 1-Integrin über *N*- oder *O*-Glykane vermittelt wird, kann die Bindung des Lektins nach PNGase F-Behandlung getestet werden. Da PNGase F nur *N*-Glykane von Glykoproteinen abspaltet, würde eine fortbestehende Assoziation mit Galektin-3 für eine *O*-Glykan-vermittelte Bindung sprechen. Dies soll in weiter führenden Studien untersucht werden. Einen genaueren Aufschluss über die an der Galektin-3-Bindung beteiligten Glykane würde eine gezielte Depletion der einzelnen Glykosyltransferasen mittels CRISPR/Cas9 liefern. Desweiteren kann mit Hilfe von Glykan-Massenspektrometrie die genaue Zusammensetzung der Kohlenhydratmodifikationen von apikal und basolateral exprimiertem β 1-Integrin analysiert werden. Solche weiterführenden Studien werden helfen, die spezifische Bindung von Galektin-3 an apikal lokalisiertes β 1-Integrin besser zu verstehen.

Auch wenn die Frage, welche Art von Glykanmodifikationen auf β 1-Integrin von Galektin-3 erkannt werden, nicht abschließend geklärt werden konnte, wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, welche Auswirkungen ein Glykosylierungsdefekt auf die Sortierung von β 1-Integrin hat. In MDCK RCA⁻-Zellen führt ein Defekt im UDP-Galaktose-Transporter im Golgi-Apparat zu Galaktose-armen und GlcNAc-reichen Zuckermodifikationen (Brändli et al., 1988).

Während die Sekretion von Galektin-3 in MDCK RCA⁻-Zellen wie in MDCK WT-Zellen vorwiegend apikal stattfindet, konnte eine stark beeinträchtigte Bindung des Lektins an die apikale Membran festgestellt werden (Abbildung 3.13). Dies kann durch das Fehlen von Galaktose in den Glykanmodifikationen von Membranproteinen und -lipiden erklärt werden. In der Konsequenz wird Galektin-3 in MDCK RCA⁻-Zellen nicht endozytiert (siehe 3.13). Im Vergleich zu MDCK WT-Zellen konnte in MDCK RCA⁻-Zellen aufgrund der beeinträchtigten Glykosylierung eine Reduktion des Molekulargewichts von β 1-Integrin und eine verstärkte apikale Lokalisation von β 1-Integrin beobachtet werden (Abbildung 3.14). Auf andere polar sortierte Proteine hat der Glykosylierungsdefekt in MDCK RCA⁻-Zellen unterschiedlichen Einfluss. In WT-Zellen apikal lokalisiertes Ceacam-1/gp114 wurde in MDCK RCA⁻-Zellen an die basolaterale Membran fehlsortiert (le Bivic et al., 1993). Dieser Sortierdefekt scheint der beeinträchtigten Galaktosylierung und der somit unterbundenen Interaktion mit Galektin-3

geschuldet zu sein, da eine Depletion von Galektin-3 in MDCK WT-Zellen denselben Effekt zeigt (Delacour et al., 2006) und keine Interaktion von Galektin-3 und Ceacam-1/gp114 in MDCK RCA⁻-Zellen stattfindet (Delacour, Greb et al., 2007). Dahingegen wurden für andere Glykoproteine keine Sortierdefekte in MDCK RCA⁻-Zellen beobachtet. So hat die beeinträchtigte Galaktosylierung keinen Einfluss auf die apikale beziehungsweise basolaterale Sortierung der viralen Influenza- und *Vesicular stomatitis* Virus (VSV)-Hüllenproteine (Green et al., 1981). Auch auf die Sekretion des vorwiegend apikal sekretierte Clusterin/gp80 konnte kein Effekt der beeinträchtigten Glykosylierung in MDCK RCA⁻-Zellen festgestellt werden (Parczyk & Koch-Brandt, 1991). Clusterin/gp80 ist wie Ceacam-1/gp114 komplex *N*-glykosyliert und trägt terminale Sialinsäuren (siehe Abbildung A.4 auf Seite xvii). Es konnte eine Interaktion des Glykoproteins mit Galektin-3 sowohl im Gesamtzelllysat, als auch im apikalen Zellkulturüberstand gezeigt werden (Abbildung A.5A). Außerdem konnte Clusterin/gp80 mit Galektin-3 von der apikalen Membrandomäne präzipitiert werden (Abbildungen A.5B und 3.3). Obwohl diese Daten eine Rolle des Lektins bei der Sortierung von Clusterin/gp80 vermuten lassen, scheint dies hier nicht der Fall zu sein. Die Sekretion von Clusterin/gp80 findet in Galektin-3 depletierten Zellen (MDCK Δ Gal3) ebenso wie in WT-Zellen vorwiegend an der apikalen Membran statt (Abbildung A.6). Auch wenn komplex glykosylierte *N*-Glykane, die von Galektin-3 mit hoher Affinität gebunden werden, als Sortiersignal fehlen, hat dies also nicht zwingend eine Konsequenz für die richtige Sortierung des betreffenden Glykoproteins. Bei diesen Überlegungen ist zu beachten, dass es sich bei Clusterin/gp80 im Gegensatz zu Ceacam-1/gp114 um ein lösliches Protein handelt und eine Rolle von Galektin-3 bisher nur beim Transport von apikalen Membranproteinen beobachtet werden konnte. Während für membranständiges Ceacam-1/gp114 eine defekte Galaktosylierung eine basolaterale Fehlsortierung zur Folge hat, spielt dies für die polare Sekretion des löslichen Glykoproteins Clusterin/gp80 keine Rolle.

Für β 1-Integrin wurde eine verstärkte Sortierung an die apikale Membran beobachtet, wenn die komplexen *N*-Glykanmodifikationen fehlen. Demnach scheint zumindest in MDCK RCA⁻-Zellen die Erkennung dieser Glykosylierung durch Galektin-3 nicht für den apikalen Transport des Integrins notwendig zu sein. Auch in Ricin-resistenten Babyhamster-

Nierenzellen, in welchen die GlcNAc-Transferase I nicht exprimiert wird, scheint die beeinträchtigte Glykosylierung nicht die Funktion von $\beta 1$ -Integrin zu beeinflussen. Zwar zeigen diese Zellen eine geringere Adhäsion, jedoch ist weder die Dimerisierung von $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin, noch dessen Oberflächenexpression oder die Bindung an Fibronectin beeinträchtigt (Koyama & Hughes, 1992).

Durch das Fehlen komplexer *N*-Glykosylierungen ist auch eine verbesserte Zugänglichkeit für weitere endogene Lektine zu anderen Zuckermodifikationen wie GlcNAc eine Erklärungsmöglichkeit für den verstärkten apikalen Transport. MDCK RCA^+ -Zellen weisen aufgrund des Galaktosemangels im Golgi-Apparat eine Anreicherung von GlcNAc-modifizierten Zuckerketten auf (Brändli et al., 1988) und es gibt eine Reihe endogener Proteine, die terminale GlcNAc-Reste erkennen. So wurden beispielsweise Vertreter der Hsp-70-Familie als *O*-GlcNAc-bindende Lektine identifiziert. Aufgrund ihrer Lokalisation wird allerdings eine Funktion dieser Lektine beim Transport von *O*-GlcNAc-modifizierten Proteinen zwischen Zytosol und Kern postuliert (Lefebvre et al., 2001) und nicht im klassischen sekretorischen Weg. Die löslichen Lektine Ficolin und Mannose-bindendes Lektin dagegen werden klassisch ins Serum sekretiert und erkennen dort GlcNAc-Reste auf der Oberfläche von Pathogenen und können über den Lektin-Weg das Komplement aktivieren (Endo et al., 2011). Es ist denkbar, dass diese Lektine bereits im Golgi GlcNAc-modifizierte Glykoproteine erkennen und diese co-transportiert werden. Ficoline und Mannose-bindende Lektine werden jedoch aufgrund ihrer Rolle bei der Immunabwehr vor allem von Leukozyten und Makrophagen beziehungsweise von der Leber exprimiert. Dennoch sind möglicherweise auch im sekretorischen Weg von MDCK-Zellen Lektine mit GlcNAc-Spezifität zu finden, welche die vermehrte apikale Sortierung in MDCK RCA^+ -Zellen bewerkstelligen könnten.

Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass $\beta 1$ -Integrin in MDCK RCA^+ -Zellen über einen anderen Transportweg die apikale Membran erreicht. Neben einer verstärkten apikalen Sortierung von neu synthetisiertem $\beta 1$ -Integrin im klassischen sekretorischen Weg, könnte

außerdem eine verminderte Endozytose des Integrins von der Plasmamembran die apikalen Expressionslevel beeinflussen. Ob in MDCK RCA⁺-Zellen also der anterograde Transport oder das Recycling von β 1-Integrin für die vermehrte apikale Lokalisation verantwortlich ist, kann anhand dieser Daten nicht beantwortet werden.

4.3. Modulation der Integrin-Lokalisation durch Galektin-3

Die Interaktion von Galektin-3 mit β 1-Integrin an der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen ist höchst interessant und aufgrund der bekannten Funktion von endosomalem Galektin-3 als Sortierfaktor im apikalen Proteintransport drängt sich die Frage auf, ob Galektin-3 auch bei der Oberflächenverteilung von β 1-Integrin beteiligt ist. Dazu wurde die Sortierung des Integrins in Zelllinien mit verschiedener Galektin-3-Expression untersucht.

Zunächst konnte beobachtet werden, dass die Galektin-3-Expression die Proteinmenge von β 1-Integrin beeinflusst. Während in Galektin-3 depletierten Zellen eine geringere β 1-Integrin-Expression beobachtet wurde, konnte in Galektin-3 überexprimierenden Zellen eine erhöhte β 1-Integrin-Expression festgestellt werden (Abbildung 3.15). Ein Zusammenhang der Expressionslevel dieser beiden Proteine wurde bereits von (Margadant et al., 2012) gezeigt. So hat die Expression von β 1-Integrin in β 1-Integrin defizienten Zellen die Expression von Galektin-3 zur Folge. Umgekehrt scheint wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, Galektin-3 die Expression von β 1-Integrin zwar zu fördern, aber keine Bedingung zu sein. So ist β 1-Integrin als häufigster Vertreter der Integrin- β 1-Untereinheit in der Niere (Kreidberg & Symons, 2000) in allen Bereichen des Nierentubulus zu finden (Abbildung 3.21), auch in Epithelzellen des proximalen Tubulus, in welchen Galektin-3 nicht exprimiert wird (Straube et al., 2011). Ebenso ist die β 1-Integrin-Expression in Galektin-3 depletierten Zellen zwar um etwa 40% vermindert (Abbildung 3.15), aber dennoch vorhanden.

Die Verteilung von $\beta 1$ -Integrin in Zelllinien mit unterschiedlicher Galektin-3-Expression wurde durch Oberflächenbiotinylierung untersucht. In MDCK Gal3-YFP-Zellen konnte eine verstärkte apikale Lokalisation des Integrins festgestellt werden, während in MDCK Δ Gal3-Zellen verminderte apikale $\beta 1$ -Integrin-Level beobachtet wurden (Abbildung 3.16). Die Zugabe von rekombinantem Galektin-3 ins apikale Kulturmedium von MDCK WT und Δ Gal3-Zellen über einen Zeitraum von 8 h hatte entsprechend eine erhöhte apikale Sortierung von $\beta 1$ -Integrin zur Folge (Abbildungen 3.16 und 3.19). Der Effekt der verstärkten apikalen Sortierung von $\beta 1$ -Integrin in MDCK Δ Gal3-Zellen ist reversibel. So geht der Anteil an apikal lokalisiertem Integrin zurück, wenn die Zellen nach Zugabe von exogenem Galektin-3 ohne weitere Zufuhr des Lektins inkubiert werden (Abbildung 3.18). Die Rolle von Galektin-3 im apikalen Transport von *lipid raft*-unabhängigen Glykoproteinen ist bekannt und gut charakterisiert (Delacour et al., 2006; Delacour, Greb et al., 2007). Galektin-3 kann durch Quervernetzung der Glykane apikaler Cargoproteinen Cluster bilden und diese so in einem post-Golgi-Kompartiment in *lipid raft*-unabhängige apikale Transportvesikel sortieren. Eine Depletion von Galektin-3 hat beispielsweise die Fehlsortierung des apikalen Markers p75^{NTR} an die basolaterale Membran zur Folge. Durch Zugabe von rekombinantem Galektin-3 kann auch dieser Transportdefekt korrigiert werden (Straube et al., 2013). Dabei beruht die Fähigkeit von Galektin-3 den apikalen Transport von $\beta 1$ -Integrin zu fördern auf der Ausbildung von Galektin-3-Oligomeren. Die Mutante hGal3C-TRX besitzt keine N-terminale Domäne und ist daher nicht in der Lage, effizient zu oligomerisieren (Lepur, Salomonsson et al., 2012). Wurden MDCK-Zellen mit hGal3C-TRX über einen Zeitraum von 8 h inkubiert, zeigte sich keine Veränderung in der Oberflächenverteilung von $\beta 1$ -Integrin (Abbildung 3.19). Es ist anzumerken, dass bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine Membrannassoziations von hGal3C-TRX mit der Plasmamembran von MDCK-Zellen beobachtet werden konnte. Vermutlich interagierten nicht genug hGal3C-TRX-Moleküle mit der Membran, um nach der Oberflächenbiotinylierung effizient isoliert zu werden. Dass die Mutante in der Lage ist, an Membranen zu binden, wenn auch nicht so effizient wie WT Galektin-3, wurde bereits gezeigt (Nieminen et al., 2007; Lepur, Carlsson et al., 2012; Carlsson et al., 2013). Zwar kann auch die Mutante durch C-typ-Oligomerisierung Oligomere ausbilden, jedoch weniger

effizient als das intakte Protein. Außerdem kann hGal3C-TRX Liganden nicht quervernetzen und damit keine Galektin-3-Cluster an der Plasmamembran ausbilden (Lepur, Salomonsson et al., 2012). So kann die in diesem Experiment nicht beobachtete Membranassoziation der Galektin-3-Mutante erklärt werden. Die Quervernetzung von Glykoliganden und die damit verbundene Ausbildung von Galektin-3-Clustern ist nicht nur für die Membranbindung des Lektins von Bedeutung, sondern auch für dessen Funktion im apikalen Proteintransport. Die Ausbildung sogenannter *high-molecular-weight cluster* (HMWC) ist essentiell für die Sortierung apikaler Cargoproteine im *lipid raft*-unabhängigen Transportweg (Delacour, Greb et al., 2007). Da Galektin-3 im *lipid raft*-unabhängigen apikalen Transport von Epithelzellen beteiligt ist, stellt sich die Frage nach der *lipid raft*-Assoziation von Integrinen. Einige Studien postulieren, dass inaktive Integrin-Formen nicht mit *lipid rafts* assoziiert sind, bei Aktivierung aber in diese rekrutiert werden und auch dort clustern (Leitinger & Hogg, 2002; Mitchell et al., 2009; Sun et al., 2016).

Während die Rolle von Galektin-3 im anterograden Transport *lipid raft*-unabhängig stattfindet, ist die Endozytose des Lektins in MDCK-Zellen *raft*-abhängig. Galektin-3 kolokalisiert mit Caveolin-1 und Flotillin-1 an der apikalen Plasmamembran und die Galektin-3-Endozytose ist bei Inhibierung der Caveolae-vermittelten Endozytose durch Filipin beeinträchtigt, wohingegen eine Inhibition der Chlatrin-abhängigen Endozytose durch Chlorpromazin keinen Effekt zeigt (Straube et al., 2013). Eine Inhibierung der Galektin-3-Endozytose durch Filipin reduziert die apikalen β 1-Integrin-Level drastisch (Abbildung 3.20). Wird sekretiertes Galektin-3 nicht endozytiert, so gelangt es nicht ins endosomale System und kann folglich seine Funktion als apikaler Sortierrezeptor im klassischen sekretorischen Weg nicht erfüllen. Eine andere Möglichkeit für Galektin-3, Zugang zum endosomalen System zu erhalten, stellt die direkte Überquerung von Membranen dar. Lukyanoc et al. (2005) konnten in einem *in vitro*-Modell zeigen, dass das Lektin per se in der Lage ist, Lipiddoppelmembranen zu überqueren. Allerdings gibt es keine Hinweise darauf, dass dies auch innerhalb der Zelle stattfindet. Bei diesem Experiment (Abbildung 3.20) bleibt anzumerken, dass Filipin durch Bindung an Cholesterol die Struktur der Lipiddoppelmembran stört (Maxfield & Wüstner, 2012) und damit eventuell auch auf den anterograden Transport Einfluss nehmen kann.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass zytosolisches Galektin-3 im Gegensatz zu endosomalem Galektin-3 keinen Einfluss auf die Sortierung von $\beta 1$ -Integrin nimmt. Galektin-3 ist im Lysat von Filipin-behandelte Zellen nach wie vor zu detektieren und dennoch zeigen diese Zellen ebenso wie MDCK Δ Gal3-Zellen reduzierte apikale $\beta 1$ -Integrin-Level. Außerdem genügt in MDCK Δ Gal3-Zellen die Zugabe von rekombinantem Lektin, welches über Endozytose in das endosomale System eintritt, um die apikale Sortierung zu erhöhen.

In der Galektin-3 KO-Maus ist die Verteilung von $\beta 1$ -Integrin nicht beeinträchtigt. Auch hier ist $\beta 1$ -Integrin vorwiegend basal lokalisiert (Abbildung 3.21). Da Galektin-3 die Sortierung des Integrins an die apikale Membran begünstigt, $\beta 1$ -Integrin aber basal lokalisiert ist, hat ein Fehlen des Lektins keine Auswirkungen auf die Sortierung. Während in den WT Mausnieren die $\beta 1$ -Integrin-Färbung vorwiegend auf die Zellmembran beschränkt ist, können in Gal3^{-/-}-Nieren auch vesikulären Strukturen innerhalb der Tubulizellen detektiert werden. Ein ähnlicher Effekt wurde in Enterozyten der Gal3^{-/-}-Maus beobachtet. Hier werden LPH und Villin nicht mehr effizient an die apikale Membran transportiert und akkumulieren intrazellulär (Delacour, Koch et al., 2007). Galektin-3 wird im adulten Nierengewebe in distalen Tubuli und in Typ-A-Schaltzellen des Sammelrohrs exprimiert. Interessanterweise ist die Galektin-3-Expression in der adulten Niere gegenüber dem fetalen Gewebe erniedrigt (Winyard et al., 1997). Daraus lässt sich eine Rolle des Lektins bei der Differenzierung des Gewebes ableiten. Dabei wird Galektin-3 nicht während der frühen Metanephrogenese, also während die Verzweigung der Ureterknospe stattfindet, in der Niere exprimiert. Wird zu diesem Zeitpunkt Galektin-3 exogen zugegeben, wird diese Verzweigung inhibiert (Bullock et al., 2001). Auch Bao und Hughes (1995) beobachteten einen inhibierenden Effekt von Galektin-3 auf die Zystenexpansion und Tubulogenese von MDCK-Zellen im Matrigel. Es ist anzumerken, dass etwas später in der Metanephrogenese Galektin-3 exprimiert wird und eine Inhibierung des Lektins während dieser Entwicklungsphase zu fehlgebildeten Strukturen führt (Bullock et al., 2001). Diese Erkenntnisse zeigen eine Rolle von Galektin-3 bei der Nierenentwicklung auf. Dabei sind sowohl zu hohe als auch zu niedrige Mengen des Lektins mit Fehlbildungen assoziiert. Auch $\beta 1$ -Integrin ist bei der Lumenbildung und Tubulogenese beteiligt (Akhtar & Streuli, 2013; Bao & Hughes, 1995). Dabei fördert $\beta 1$ -Integrin die Ausbil-

dung von Tubuli. Galektin-3 ist mit einer Verringerung der Zelladhäsion assoziiert (Ochieng et al., 1998; Friedrichs et al., 2008; Priglinger et al., 2013), welche möglicherweise dadurch zu erklären ist, dass die Bindung von Galektin-3 an β 1-Integrin die Assoziation mit Matrixkomponenten wie Laminin oder Fibronectin verringert. Ebenso ist denkbar, dass Galektin-3 die Zelladhäsion durch die Modulation der Oberflächenexpression von β 1-Integrin beeinflussen kann.

Der Effekt von Galektin-3 auf die Verteilung von β 1-Integrin an der Plasmamembran von MDCK-Zellen kann auf verschiedene Weise vermittelt werden. So könnte Galektin-3 durch Umverteilung von β 1-Integrin an den beiden Membrandomänen und/oder durch die Sortierung von neu synthetisiertem β 1-Integrin im sekretorischen Weg Einfluss auf dessen Verteilung nehmen. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Pulsmarkierung von neu synthetisierten Proteinen β 1-Integrin bereits 1 h nach *chase* an beiden Membrankompartimenten detektiert werden (Abbildung 3.22). Auch wenn eine Umverteilung von neu synthetisiertem β 1-Integrin durch Transzytose zu früheren Zeitpunkten hier nicht ausgeschlossen werden kann, sprechen diese Daten für einen direkten Transport an die jeweilige Membran. Kürzere Zeitpunkte konnten mit Hilfe dieses Experiments aufgrund der geringen apikalen β 1-Integrin-Mengen nicht untersucht werden. Die apikal isolierten β 1-Integrin-Level lagen auch nach 1 h nur knapp über der Detektionsgrenze. Während in zahlreichen Arbeiten die Endozytose und das Recycling von Integrinen untersucht wurde, liegen kaum Studien zur Biosynthese und zum Transport von neu synthetisierten Integrinen vor. Die meisten Zellen exprimieren verschiedene $\alpha\beta$ 1-Integrin-Heterodimere. Die β 1-Untereinheit wird im Überschuss hergestellt und kann im ER mit verschiedenen α -Untereinheiten assoziieren, bevor das Heterodimer weiter zum Golgi transportiert wird (Heino et al., 1989). Dabei wird die β 1-Untereinheit solange im ER von Calnexin zurückgehalten, bis eine Assemblierung mit einer α -Untereinheit erfolgt (Lenter & Vestweber, 1994; Hotchin et al., 1995). In humanen Fibroblasten beträgt die Halbwertszeit der Überführung der β 1-Integrin-Vorläuferform in das reife Glykoprotein 10 h, nach Stimulation mit TGF- β 1 3 h (Heino et al., 1989). Die Assemblierung der α 4-Untereinheit mit β 4-Integrin benötigt 30 min in Adenokarzinomzellen (Rigot et al., 1999). Aus diesen Daten kann abgeleitet werden, dass eine vollständige Reifung

von neu synthetisiertem β 1-Integrin, inklusive der Assemblierung mit einer α -Untereinheit im ER, der Glykosylierung im Golgi und dem Transport an die Plasmamembran in weniger als 1.5 h (30 min Pulsmarkierung und 1 h *chase*) unwahrscheinlich ist.

Die Zugabe von exogenem Galektin-3 konnte die apikale Transportrate von neu synthetisiertem β 1-Integrin in MDCK Δ Gal3-Zellen steigern, wohingegen der basolaterale Transport unverändert blieb (Abbildung 3.23). Hinweise, dass endozytiertes Galektin-3 beim *de novo*-Transport apikaler Membranproteine beteiligt ist, lieferten bereits Daten von Straube et al. (2013). So kolokalisierten internalisiertes Galektin-3 und neu synthetisiertes p75^{NTR} in einem endosomalen Kompartiment, bevor p75^{NTR} an der apikalen Plasmamembran detektiert werden konnte. Außerdem konnte exogenes Galektin-3 die basolaterale Fehlsortierung von p75^{NTR} in Galektin-3 depletierten Zellen korrigieren. Auch andere rekombinante Galektine können Transportdefekte, die durch das Fehlen des entsprechenden Lektins zustande kommen, beheben. So kann ein Transportdefekt von Influenza HA in Galektin-9 *Knockdown* (KD)- und DPPIV in Galektin-4 KD-MDCK-Zellen durch die Zugabe von Galektin-9 beziehungsweise Galektin-4 beseitigt werden (Mishra et al., 2010; Stechly et al., 2009). Demnach sind Galektine in der Lage, den anterograden Transport neu synthetisierter apikaler Glykoproteine zu modulieren, auch wenn sie nur exogen zugegeben werden.

Extrazelluläres Galektin-3 wird in MDCK-Zellen ausschließlich an der apikalen Membrandomäne endozytiert. Basolateral konnte keine Aufnahme festgestellt werden (Abbildung 3.24). Dies wurde für exogen zugegebenes, rekombinantes Galektin-3 beobachtet, welches hauptsächlich an die apikale Membran bindet. Die Endozytose von endogenem, Membranassoziierten Galektin-3, welches sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Membran detektiert werden konnte, wurde aufgrund der geringen Membran-gebundenen Mengen nicht analysiert.

β 1-Integrin und Galektin-3 werden in MDCK-Zellen gemeinsam internalisiert. So konnte β 1-Integrin mit endozytiertem hGal3-Biotin co-präzipitiert werden und umgekehrt war endogenes Galektin-3 mit internalisiertem β 1-Integrin assoziiert (Abbildungen 3.25 und 3.26). Die Co-Internalisierung von β 1-Integrin und Galektin-3 konnte auch in anderen Zell-

linien beobachtet werden. So induziert die Inkubation von humanen Brustkrebszellen mit rekombinantem Galektin-3 die Endozytose von $\beta 1$ -Integrin, welches daraufhin nur noch intrazellulär und nicht mehr an der Plasmamembran zu detektieren ist (Furtak et al., 2001). Die Endozytose des Integrins konnte in diesen Zellen durch Filipin, aber nicht durch Chlorpromazin inhibiert werden. In einer Fibroblastenzelllinie dagegen war die $\beta 1$ -Integrin-Endozytose durch den *Knockdown* von Galektin-3 eingeschränkt, und konnte bei einem zusätzlichen *Knockdown* von Clathrin noch stärker inhibiert werden (Lakshminarayan et al., 2014). In diesen Zellen scheint daher neben der Caveolae-vermittelten Endozytose auch ein Clathrin-abhängiger Weg bei der Internalisierung von $\beta 1$ -Integrin eine Rolle zu spielen.

Bei der gemeinsamen Aufnahme von Galektin-3 und $\beta 1$ -Integrin nahm der Grad der Assoziation der beiden Proteine im zeitlichen Verlauf der Endozytose zunächst ab und stieg im weiteren Verlauf wieder an (Abbildung 3.25). Diese Beobachtung spiegelt vermutlich die Passage durch verschiedene endosomale Kompartimente wieder. Nach der Endozytose von Galektin-3, erfolgt die Disassemblierung von Galektin-3-Clustern in angesäuerten, frühen Endosomen. Freies Galektin-3 kann dann in einem Sortierkompartiment mit höherem pH, durch die Ausbildung von HMWC, apikales Cargo in *lipid raft*-unabhängige Transportvesikel rekrutieren (Hönig et al., 2015). Diese Hypothese wird durch Erkenntnisse von Schneider et al. (2010) und von Mach et al. (2013) gestützt, die zeigen konnten, dass internalisiertes Galektin-3 in einem sauren Kompartiment akkumuliert und die Clusterbildung von p75^{NTR} durch Galektin-3 nicht bei einem saurem pH stattfinden kann.

Während für die Endozytose von Galektin-3 in Makrophagen ein Zucker-abhängiger sowie ein Zucker-unabhängiger Weg beschrieben wurde (Lepur, Carlsson et al., 2012), kann diese in MDCK-Zellen durch Laktose vollständig inhibiert werden (Schneider et al., 2010). Eine Laktose-Inkubation beeinträchtigte die Internalisierung von $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Membran jedoch nicht (Abbildung 3.26). Dies kann einerseits auf eine Zucker-unabhängige Interaktion von Galektin-3 und $\beta 1$ -Integrin während der Endozytose hindeuten, oder andererseits auf verschiedene Endozytoserouten von $\beta 1$ -Integrin schließen lassen. So konnte zwar endogenes Galektin-3 nach einer 30-minütigen Endozytose mit $\beta 1$ -Integrin präzipitiert werden, jedoch muss diese Interaktion nicht zwangsläufig schon an der Plasmamem-

bran bestanden haben. Denkbar ist eine Assoziation der beiden Proteine nach erfolgter Internalisierung, mutmaßlich in einem Sortierkompartiment, in welchem Galektin-3 uninhibiert vorliegt. Dafür spricht die Beobachtung, dass die bekannten Funktionen von extrazellulärem beziehungsweise lumenalem Galektin-3 durch Glykan-Interaktionen vermittelt werden, wohingegen Protein-Protein-Interaktionen vornehmlich auf das Zytosol beschränkt sind, da hier keine Galektin-Glykanliganden zu finden sind (Akimoto et al., 2009). In Zellen bei denen die β 1-Integrin-Endozytose nur Clathrin-unabhängig stattfindet, kann diese durch Laktose inhibiert werden (Furtak et al., 2001). Lakshminarayan et al. (2014) konnten zeigen, dass die Endozytose von β 1-Integrin über CLICs von Galektin-3 abhängig ist. Bei diesem Endozytoseweg ist Galektin-3 bei der Membranınvasion beteiligt und somit unabdingbar für diesen Prozess. Da in den hier untersuchten MDCK-Zellen keine Inhibierung durch Laktose erfolgte, sind folgende Schlussfolgerungen möglich: Galektin-3 ist hier nicht bei der β 1-Integrin-Endozytose beteiligt, oder es besteht in MDCK-Zellen neben der Galektin-3-vermittelten Integrin-Internalisierung einen zweiten, Galektin-3-unabhängigen und vermutlich Clathrin-abhängigen Endozytoseweg für β 1-Integrin. Hierbei ist eine Beteiligung von Galektin-3 zur Induktion der Endozytose nicht notwendig. Eine Assoziation der beiden Proteine kann im weiteren intrazellulären Transport aber durchaus stattfinden.

Galektin-3 kann die Oberflächenexpression von Glykoproteinen nicht nur über deren Internalisierung durch Endozytose regulieren, sondern auch über deren Retention durch Quervernetzung an der Membran (Nabi et al., 2015). Da die Inhibierung von Galektin-3 durch Laktose die Endozytose von β 1-Integrin aber auch nicht fördert, kann aus diesem Experiment außerdem abgeleitet werden, dass Galektin-3 nicht zur Retention des Rezeptors an der apikalen Membran beiträgt.

Internalisierte Integrine werden ins frühe Endosom transportiert und für die Degradation oder das Recycling zurück an die Plasmamembran sortiert (Bridgewater et al., 2012). Dabei wird der Großteil der endozytierten Integrine recycelt (Bretscher, 1989, 1992). Für das Recycling von Integrinen an die Plasmamembran sind zwei verschiedene Mechanismen beschrieben, die als *short loop*- und *long loop*-Recyclingweg bezeichnet werden. Das Recycling durch den *short loop*-Weg ist Rab4-abhängig und fördert den schnellen Rücktransport

an die Plasmamembran. Inaktives $\beta 1$ -Integrin wird beispielsweise über diesen Weg recycelt. Integrine, die über den *long loop*-Weg recycelt werden, passieren dagegen ein Rab11-positives perinukleäres Recycling Kompartiment. Dieser Weg ist im Recycling von aktivem $\beta 1$ -Integrin beteiligt (Arjonen et al., 2012; Franceschi et al., 2015). Da Galektin-3 in MDCK-Zellen in Rab4-, Rab8- und Rab11-positiven Kompartimenten vorzufinden ist (Schneider et al., 2010), ist eine Beteiligung des Lektins bei beiden Integrin-Recycling-Wegen denkbar. Ob es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten $\beta 1$ -Integrin um eine aktive oder inaktive Form des Integrins handelt, ist nicht bekannt. Weiter führende Studien mit Hilfe von Antikörpern, die die Konformation und damit den Aktivierungszustand des Integrins erkennen können, sowie die Analyse der während des Recyclings passierten endosomalen Kompartimente werden Aufschluss darüber geben, bei welchem der Wege Galektin-3 eine Rolle spielt.

4.4. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Rolle des Lektins Galektin-3 bei der Oberflächenverteilung eines Vertreters der Integrin-Familie, $\beta 1$ -Integrin aufgezeigt werden. Galektin-3, dessen Rolle im *lipid raft*-unabhängigen apikalen Proteintransport bereits gut verstanden ist, fördert auch die apikale Membranlokalisation von $\beta 1$ -Integrin. So ist ein Fehlen des Lektins durch *Gen-Knockout* mit einer verminderten apikalen $\beta 1$ -Integrin-Expression assoziiert. Auch die Entfernung von Galektin-3 aus dem endosomalen System durch Inhibierung der Caveolae-vermittelten Endozytose depletiert $\beta 1$ -Integrin von der apikalen Domäne. Eine Überexpression von Galektin-3 sowie die Supplementierung mit rekombinantem Protein verstärkt die Sortierung an die apikale Membran. Diese Modulation der Verteilung von $\beta 1$ -Integrin an der Plasmamembran wird zumindest teilweise durch die Galektin-3-vermittelte Sortierung von neu synthetisiertem $\beta 1$ -Integrin in den apikalen Transportweg bewerkstelligt. Darüber hinaus ist durch die Ausbildung von Lektin-Netzwerken zwischen Galektin-3, $\beta 1$ -Integrin und möglicherweise weiteren Proteinen eine Retention des Rezeptors an der apikalen Membran vorstellbar. Es ist bereits bekannt, dass die apikale Protein-

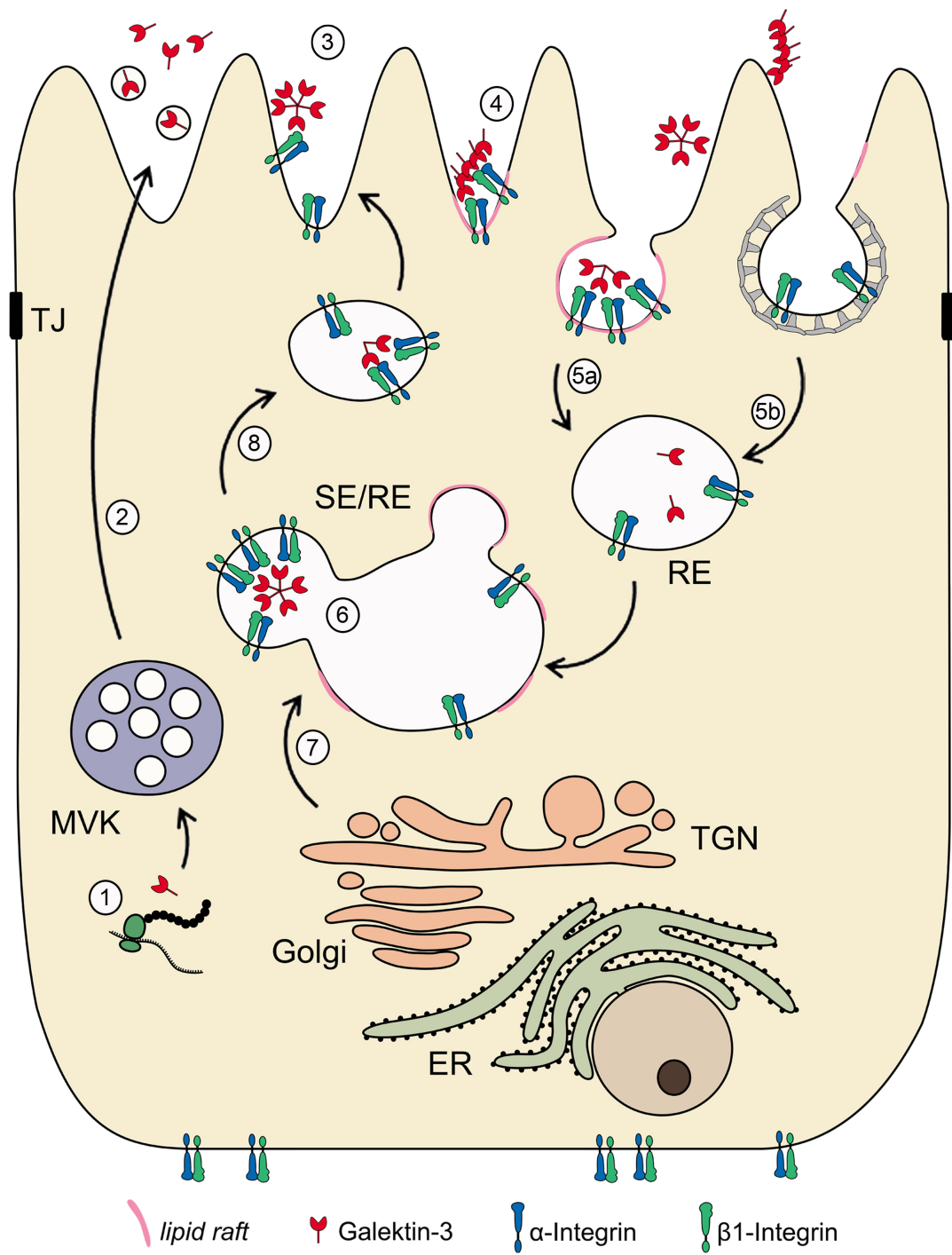
sortierung durch Galektin-3 *lipid raft*-unabhängig stattfindet. Desweiteren ist bekannt, dass β 1-Integrin erst nach Aktivierung *lipid raft*-assoziiert ist und neu synthetisierte Integrin-Heterodimere während ihres intrazellulären Transports normalerweise inaktiv vorliegen. Diese Beobachtungen legen eine Rolle von Galektin-3 beim *de novo*-Transport von inaktivem β 1-Integrin an die apikale Plasmamembran von Epithelzellen nahe. Weiterführende Untersuchungen mit Hilfe Konformations-sensitiver Antikörper werden helfen, den Aktivierungsstatus des Integrins während des intrazellulären Transports zu bestimmen.

Die Endozytose von Galektin-3 und damit seine Präsenz im endosomalen System ist unabdingbar für die apikale Lokalisation von β 1-Integrin. Während endozytiertes Galektin-3 die Expression von β 1-Integrin an der apikalen Membran fördert, kann zytosolisches Galektin-3 in Zellen mit inhibierter Galektin-3-Endozytose die apikale Sortierung nicht bewerkstelligen. In dieser Arbeit konnte einerseits gezeigt werden, dass die Endozytose von β 1-Integrin in MDCK-Zellen Zucker-unabhängig stattfinden kann und andererseits konnte eine Co-Internalisierung von Galektin-3 und β 1-Integrin an der apikalen Membran demonstriert werden. Diese Erkenntnisse können entweder dahingehend interpretiert werden, dass Galektin-3 keine Rolle für die Induktion der Endozytose von β 1-Integrin spielt, oder sie deuten auf die Möglichkeit von zwei verschiedenen Endozytosewege für β 1-Integrin in MDCK-Zellen hin. Da die Galektin-3-Endozytose *lipid raft*-abhängig stattfindet spricht die beobachtete Co-Internalisierung von β 1-Integrin für einen Clathrin-unabhängigen Weg, wie er bereits in anderen Zelllinien beschrieben wurde. Bemerkenswert ist, dass die β 1-Integrin-Endozytose auch unter Anwesenheit von Laktose und demnach Galektin-3-unabhängig stattfindet. Daraus kann auf einen weiteren, wahrscheinlich Clathrin-abhängigen Weg geschlossen werden. Die genaue Untersuchung der Beteiligung der verschiedenen Endozytosewege bei der Internalisierung von β 1-Integrin, sowie die Bestimmung der assoziierten α -Untereinheit, des Aktivierungszustandes und der endosomalen Transportroute werden in zukünftigen Studien Aufschluss über die Rolle dieser Mechanismen bei der Regulation der Integrin-Homöostase geben.

Die Bedeutung der Galektin-3-vermittelten Sortierung von β 1-Integrin in Epithelzellen wird sich mit Hilfe von Erkenntnissen zur Funktion von apikal lokalisierten Integrinen

erschließen lassen. Denkbar ist die Transduktion von Umwelteinflüssen durch *outside-in signaling*, wie es beispielsweise in Endothelzellen für die Regulation des Blutdrucks beschrieben wurde (Yang & Rizzo, 2013). In der Niere werden Integrine normalerweise basal exprimiert. Jedoch ist $\beta 1$ -Integrin während der Entwicklung des Metanephrons an allen Oberflächen zu finden (Korhonen et al., 1990a, 1990b) und auch nach einem ischämischen Niereninfarkt wird $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Membran detektiert (Zuk & Matlin, 2002). Hier wird eine Rolle des Integrins bei der epithelialen Wundheilung postuliert. Ein genaues Verständnis darüber, welche Heterodimere hierbei beteiligt sind und wie genau die Modulation der Oberflächenverteilung durch Galektin-3 von statten geht, kann die Entwicklung neuer Therapieansätze ermöglichen. Die Regulierung der Integrin-vermittelten Zelladhäsion durch Galektin-3 stellt außerdem weitere Forschungsansätze dar. Die Dynamik der Zellkontakte zur Extrazellulären Matrix sind nicht nur bei der Zellmigration sondern auch bei der Zellteilung und der Epithelial-mesenchymalen Transition (Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)), einem Prozess der epithelialen Dedifferenzierung, von großer Bedeutung. Ob eine oftmals erhöhte Galektin-3-Expression in Tumorgewebe eine Rolle bei der manipulierten Zelladhäsion von Tumorzellen durch eine veränderte Integrin-Sortierung spielt, werden zukünftige Studien untersuchen.

Abbildung 4.1. (nächste Seite): Modell apikaler Transportprozesse von Galektin-3 und β 1-Integrin. 1) Die Biosynthese von Galektin-3 erfolgt an freien Ribosomen im Zytosol. 2) Galektin-3 wird über einen unkonventionellen Mechanismus an der apikalen Membran sekretiert. Dazu wird es vermutlich in Multivesikuläre Körperchen (MVB) rekrutiert und verlässt die Zelle via Exosomen. 3) Im Extrazellularraum sind zahlreiche Liganden für das Lektin vorhanden, da Glykanmodifikationen von Glykolipiden- und Proteinen nach außen gerichtet sind. 4) Galektin-3 bindet unter anderen Glykoliganden auch β 1-Integrin an der apikalen Zelloberfläche. Eine denkbare Funktion dieser Interaktion ist die Ausbildung von aktiven Integrin-Heterodimer-Clustern. 5) β 1-Integrin wird an der apikalen Oberfläche endozytiert. 5a) Galektin-3 und β 1-Integrin können gemeinsam internalisiert werden. Dies erfolgt vermutlich über einen *lipid raft*-abhängigen Weg. Galektin-3 ist für diesen Prozess nicht unbedingt notwendig, oder es besteht ein zweiter, Galektin-3-unabhängiger und vermutlich Clathrin vermittelter Endozytosemechanismus für β 1-Integrin (5b). Endozytiertes Galektin-3 erhält somit Zugang zum endosomalen System und internalisierte Integrine werden vermutlich zurück an die apikale Membran recycelt. 6) Galektin-3 dient als Sortierrezeptor im *lipid raft*-unabhängigen klassischen sekretorischen Weg. In einem post-Golgi Kompartiment (RE/SE) können sowohl recycelnde als auch neu synthetisierte Integrine (7) mit Hilfe von Galektin-3 in diesen apikalen Transportweg sortiert werden (8). ER = Endoplasmatisches Retikulum, MVK = Multivesikuläres Körperchen, RE = Recyclingendosom, SE = Sortierendosom, TGN = *trans*-Golgi-Netzwerk, TJ = *tight junction*.



Literatur

- Ahmad, N., André, H. G. S., Kaltner, H., Sabesan, S., Roy, R., Liu, B., ... Brewer, C. (2004). Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem*, 279 (12), 10841-7.
- Akhtar, N. & Streuli, C. (2013). An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nat Cell Biol*, 15 (1), 17-27.
- Akimoto, Y., Brockhausen, I., Colley, K., Crocker, P., Doering, T., Elbein, A., ... West, C. (2009). *Essentials of glycobiology, 2nd edition* (A. Varki et al., Hrsg.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell* (5th edition Aufl.). New York: Garland Science.
- Arjonen, A., Alanko, J., Veltel, S. & Ivaska, J. (2012). Distinct recycling of active and inactive $\beta 1$ integrins. *Traffic*, 13 (4), 610-25.
- Bao, Q. & Hughes, R. (1995). Galectin-3 expression and effects on cyst enlargement and tubulogenesis in kidney epithelial MDCK cells cultured in three-dimensional matrices in vitro. *J Cell Sci*, 108 (8), 2791-800.
- Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res*, 339 (1), 269-80.
- Barondes, S., Cooper, D., Gitt, M. & Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, 269 (33), 20807-10.
- Bellis, S. (2004). Variant glycosylation: an underappreciated regulatory mechanism for beta1 integrins. *Biochim Biophys Acta*, 1663 (1-2), 52-60.
- Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer, L. (2012). *Biochemistry* (7th Edition Aufl.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Boscher, C., Dennis, J. & Nabi, I. (2011). Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 23 (4), 383-92.
- Boscher, C. & Nabi, I. (2013). Galectin-3- and phospho-caveolin-1-dependent outside-in integrin signaling mediates the EGF mitogenic response in mammary cancer cells. *Mol Biol Cell*, 24 (13), 2134-45.
- Bouvard, D., Pouwels, J., Franceschi, N. D. & Ivaska, J. (2013). Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14 (7), 430-42.
- Brändli, A., Hansson, G., Rodriguez-Boulán, E. & Simons, K. (1988). A polarized epithelial cell mutant deficient in translocation of udp-galactose into the golgi complex. *J Biol Chem*, 263, 16283-90.

- Bretscher, M. (1989). Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells. *EMBO Journal*, 8 (5), 1341-1348.
- Bretscher, M. (1992). Circulating integrins: alpha 5 beta 1, alpha 6 beta 4 and Mac-1, but not alpha 3 beta 1, alpha 4 beta 1 or LFA-1. *EMBO Journal*, 11 (2), 405-410.
- Brewer, C. & Roth, M. (1991). A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol*, 114 (3), 413-21.
- Bridgewater, R., Norman, J. & Caswell, P. (2012). Integrin trafficking at a glance. *J Cell Sci*, 125 (16), 3695-701.
- Brown, P., Wang, E., Aroeti, B., Chapin, S., Mostov, K. & Dunn, K. (2000). Definition of distinct compartments in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells for membrane-volume sorting, polarized sorting and apical recycling. *Traffic*, 1 (2), 124-40.
- Bullock, S., Johnson, T., Bao, Q., Hughes, R., Winyard, P. & Woolf, A. (2001). Galectin-3 modulates ureteric bud branching in organ culture of the developing mouse kidney. *J Am Soc Nephrol*, 12 (3), 515-23.
- Campbell, I. & Humphries, M. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3 (3), pii: a004994.
- Carlsson, M., Bengtson, P., Cucak, H. & Leffler, H. (2013). Galectin-3 guides intracellular trafficking of some human serotransferrin glycoforms. *J Biol Chem*, Epub, Epub.
- Carmosino, M., Valenti, G., Caplan, M. & Svelto, M. (2009). Polarized traffic towards the cell surface: how to find the route. *Biol Cell*, 102 (2), 75-91.
- Casanova, J., Mishumi, Y., Ikehara, Y., Hubbard, A. & Mostov, K. (1991). Direct apical sorting of rat liver dipeptidylpeptidase iv expressed in madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem*.
- Cereijido, M., Robbins, E., Dolan, W., Rotunno, C. & Sabatini, D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol*, 77 (3), 853-80.
- Chao, W. & Kunz, J. (2009). Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS Lett*, 583 (8), 1337-43.
- Chuang, J. & Sung, C. (1998). The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Cell Biol*, 142 (5), 1245-56.
- Collins, P., Bum-Erdene, K., Yu, X. & Blanchard, H. (2014). Galectin-3 interactions with glycosphingolipids. *J Mol Biol*, 426 (7), 1439-51.
- Colnot, C., Fowles, D., Ripoche, M., Bouchaert, I. & Poirier, F. (1998). Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn*, 211 (4), 306-13.

- Conchello, J. A. & Lichtman, J. W. (2005). Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*, 2, 920-31.
- Delacour, D., Cramm-Behrens, C., Drobecq, H., Bivic, A. L., Naim, H. & Jacob, R. (2006). Requirement for galectin-3 in apical protein transport. *Curr Biol*, 16, 408-414.
- Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Bivic, A. L. & Jacob, R. (2007). Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic*, 8, 379-88.
- Delacour, D., Koch, A., Ackermann, W., Parco, I. E.-L., Elsässer, H., F. F. P. & Jacob, R. (2007). Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes in vivo. *J Cell Sci*, 121, 458-65.
- Dennis, J. & Brewer, C. (2013). Density-dependent lectin-glycan interactions as a paradigm for conditional regulation by posttranslational modifications. *Mol Cell Proteomics*, 12 (4), 913-20.
- Dennis, J., Pawling, J., Cheung, P., Partridge, E. & Demetriou, M. (2002). UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice. *Biochim Biophys Acta*, 1573 (3), 414-22.
- Doherty, G. & McMahon, H. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78, 857-902.
- Dukes, J., Whitley, P. & Chalmers, A. (2011). The MDCK variety pack choosing the right strain. *BMC Cell Biol*, 12.
- Dumic, J., Dabelic, S. & Flögel, M. (2006). Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*, 1760 (4), 616-35.
- Elola, M., Blidner, A., Ferragut, F., Bracalente, C. & Rabinovich, G. (2015). Assembly, organization and regulation of cell-surface receptors by lectin-glycan complexes. *Biochem J*, 469 (1), 1-16.
- Endo, Y., Matsushita, M. & Fujita, T. (2011). The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol*, 43 (5), 705-12.
- Evans, E. & Calderwood, D. (2007). Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science*, 316 (5828), 1148-53.
- Ezratty, E., Bertaux, C., Marcantonio, E. & Gundersen, G. (2009). Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol*, 187 (5), 187:733-747.
- Finnemann, S., Bonilha, V., Marmorstein, A. & Rodriguez-Boulan, E. (1997). Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (24), 12932-7.

- Finnemann, S. & Silverstein, R. (2001). Differential roles of CD36 and α v β 5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *J Exp Med*, 194 (9), 1289-98.
- Franceschi, N. D., Hamidi, H., Alanko, J., Sahgal, P. & Ivaska, J. (2015). Integrin traffic - the update. *J Cell Sci*, 128 (5), 839-52.
- Franco, S., Rodgers, M., Perrin, B., Han, J., Bennin, D., Critchley, D. & Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol*, 6 (10), 977-83.
- Freeze, H. (2001). Use of glycosidases to study protein trafficking. *Curr Protoc Cell Biol*, Unit 15.2.
- Friedrichs, J., Manninen, A., Muller, D. & Helenius, J. (2008). Galectin-3 regulates integrin α 2 β 1-mediated adhesion to collagen-I and -IV. *J Biol Chem*, 283, 32264-72.
- Fuller, S. & Simons, K. (1986). Transferrin receptor polarity and recycling accuracy in "tight" and "leaky" strains of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, 103, 1767-79.
- Furtak, V., Hatcher, F. & Ochieng, J. (2001). Galectin-3 mediates the endocytosis of β 1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 845-50.
- Gabius, H. (1997). Animal lectins. *Eur J Biochem*, 234 (3), 543-76.
- Gabius, H., André, S., Kaltner, H. & Siebert, H. (2002). The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta*, 1572, 165-77.
- Geisler, C. & Jarvis, D. (2011). Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology*, 21 (8), 988-93.
- Green, R., Meiss, H. & Rodriguez-Boulán, E. (1981). Glycosylation does not determine segregation of viral envelope proteins in the plasma membrane of epithelial cells. *J Cell Biol*, 89 (2), 230-9.
- Gupta, R., Jung, E. & Brunak, S. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *in preparation*.
- Hansen, C. & Nichols, B. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci*, 122 (Pt 11), 1713-21.
- Harburger, D. & Calderwood, D. (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci*, 122 (Pt 2), 159-63.
- Heino, J., Ignatz, R., Hemler, M., Crouse, C. & Massagué, J. (1989). Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . concomitant regulation of integrins that share a common β 1 subunit. *J Biol Chem*, 264 (1), 380-8.

- Herrmann, J., Turck, C., Atchison, R., Huflejt, M., Poulter, L., Gitt, M., ... Leffler, H. (1993). Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J Biol Chem*, 268 (35), 26704-11.
- Hesse, M., Meier, H. & Zeeh, B. (2007). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hirabayashi, J. & Kasai, K. (1993). The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*, 3, 297-304.
- Ho, M. & Springer, T. (1982). Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 128 (3), 1221-8.
- Holíková, Z., Hrdlicková-Cela, E., Plzák, J., Smetana, K. J., Betka, J., Dvoránková, B., ... Gabius, H. (2002). Defining the glycophenotype of squamous epithelia using plant and mammalian lectins. Differentiation-dependent expression of alpha2,6- and alpha2,3-linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and carcinomas, and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectins-1 and -3. *APMIS*, 110 (12), 845-56.
- Hönig, E., Schneider, K. & Jacob, R. (2015). Recycling of galectin-3 in epithelial cells. *Eur J Cell Biol*, 94 (7-9), 309-15.
- Hotchin, N., Gandarillas, A. & Watt, F. (1995). Regulation of cell surface β 1-integrin levels during keratinocyte terminal differentiation. *J Cell Biol*, 128 (6), 1209-1219.
- Hua, W., Sheff, D., Toomre, D. & Mellman, I. (2006). Vectorial insertion of apical and basolateral membrane proteins in polarized epithelial cells revealed by quantitative 3D live cell imaging. *J Cell Biol*, 172 (7), 1035-44.
- Hughes, R. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1473 (1), 172-85.
- Humphries, J., Byron, A. & Humphries, M. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119, 3901-3.
- Humphries, M. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, 28 (4), 311-39.
- Humphries, M., Symonds, E. & Mould, A. (2003). Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr Opin Struct Biol*, 13 (2), 236-43.
- Hynes, R. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110 (6), 673-87.
- Jacob, R. & Naim, H. (2001). Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr Biol*, 11, 1444-50.

- Jacob, R., Preuss, U., Panzer, P., Alfalah, M., Quack, S., Roth, M., ... Naim, H. (1999). Hierarchy of sorting signals in chimeras of intestinal lactase-phlorizin hydrolase and the influenza virus hemagglutinin. *J Biol Chem*, 274 (12), 8061-7.
- Janssen, K. (2014). *Polare Sekretion von Clusterin in Epithelzellen der Niere und des Darms* (Unveröffentlichte Diplomarbeit). Philipps-Universität Marburg.
- Jaulin, F., Xue, X., Rodriguez-Boulán, E. & Kreitzer, G. (2007). Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev Cell*, 13, 511-22.
- Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci*, 15 (8), 291-4.
- Korhonen, M., Ylännä, J., Laitinen, L. & Virtanen, I. (1990a). Distribution of beta1 and beta 3 integrins in human fetal and adult kidney. *Lab Invest*, 62 (5), 616-25.
- Korhonen, M., Ylännä, J., Laitinen, L. & Virtanen, I. (1990b). The $\alpha 1$ - $\alpha 6$ subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron. *J Cell Biol*, 111 (3), 1245-54.
- Koyama, T. & Hughes, R. (1992). Functional integrins from normal and glycosylation-deficient baby hamster kidney cells. Terminal processing of asparagine-linked oligosaccharides is not correlated with fibronectin-binding activity. *J Biol Chem*, 267 (36), 25939-44.
- Kreidberg, J. & Symons, J. (2000). Integrins in kidney development, function, and disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279 (2), F233-42.
- Kundu, A., Avalos, R., Sanderson, C. & Nayak, D. (1996). Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol*, 70 (9), 6508-15.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-5.
- Lagana, A., Goetz, J., Cheung, P., Raz, A., Dennis, J. & Nabi, I. (2006). Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol Cell Biol*, 26 (8), 3181-93.
- Lakshminarayan, R., Wunder, C., Becken, U., Howes, M., Benzing, C., Arumugam, S., ... Johannes, L. (2014). Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*, 16 (6), 595-606.
- le Bivic, A., Garcia, M. & Rodriguez-Boulán, E. (1993). Ricin-resistant madin-darby canine kidney cells missort a major endogenous apical sialoglycoprotein. *J Biol Chem*, 268, 6909-16.

- le Bivice, A., Sambuy, Y., Patzak, A., Patil, N., Chao, M. & Rodriguez-Boulan, E. (1991). An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J Cell Biol*, 115 (3), 607-18.
- Lee, J. & Streuli, C. (2014). Integrins and epithelial cell polarity. *J Cell Sci*, 127 (Pt 15), 3217-25.
- Lefebvre, T., Cieniewski, C., Lemoine, J., Guerardel, Y., Leroy, Y., Zanetta, J. & Michalski, J. (2001). Identification of N-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J*, 360 (Pt 1), 179-88.
- Leffler, H. & Barondes, S. (1986). Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. *J Biol Chem*, 261, 10119-26.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. & Poirier, F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconj J*, 19, 433-40.
- Leitinger, B. & Hogg, N. (2002). The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J Cell Sci*, 115 (Pt 5), 963-72.
- Lenter, M. & Vestweber, D. (1994). The integrin chains beta 1 and alpha 6 associate with the chaperone calnexin prior to integrin assembly. *J Biol Chem*, 269 (16), 12263-8.
- Lepur, A., Carlsson, M., Novak, R., Dumi?, J., Nilsson, U. & Leffler, H. (2012). Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochim Biophys Acta*, 1820, 804-18.
- Lepur, A., Salomonsson, E., Nilsson, U. & Leffler, H. (2012). Ligand induced galectin-3 protein self-association. *J Biol Chem*, 287, 21751-6.
- Li, P., Banjade, S., Cheng, H., Kim, S., Chen, B., Guo, L., ... Rosen, M. (2012). Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, 483 (7389), 336-40.
- Lichtman, J. W. & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 2, 910-9.
- Lin, S., Naim, H., Rodriguez, A. & Roth, M. (1998). Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 142 (1), 51-7.
- Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S., Mostov, K. & Leffler, H. (1993). Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J Biol Chem*, 268, 11750-7.
- Lisanti, M., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. & Rodriguez-Boulan, E. (1988). Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (24), 9557-61.

- Liu, C., Hu, R., Huang, M., Lai, I., Chen, C., Lai, H., ... Huang, M. (2014). C1GALT1 promotes invasive phenotypes of hepatocellular carcinoma cells by modulating integrin β 1 glycosylation and activity. *PLoS One*, 9 (8), e94995.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Bretscher, A., ... Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology* (6th edition Aufl.). New York: Freeman.
- Long, E. (2011). ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion. *J Immunol*, 186 (9), 5021-3.
- Lowe, J. & Marth, J. (2003). A genetic approach to mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem*, 72, 643-91.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 (1), 265-75.
- Lukyanoc, P., Furtak, V. & Ochieng, J. (2005). Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 1031-6.
- Margadant, C., Monsuur, H., Norman, J. & Sonnenberg, A. (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, 23 (5), 607-14.
- Margadant, C., van den Bout, I., van Boxtel, A., Thijssen, V. & Sonnenberg, A. (2012). Epigenetic regulation of galectin-3 expression by β 1 integrins promotes cell adhesion and migration. *J Biol Chem*, 287 (53), 44684-93.
- Martel, V., Vignoud, L., Dupé, S., Frachet, P., Block, M. & Albigés-Rizo, C. (2000). Talin controls the exit of the integrin alpha 5 beta 1 from an early compartment of the secretory pathway. *J Cell Sci*, 113 (Pt 11), 1951-61.
- Maxfield, F. & Wüstner, D. (2012). Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes. *Methods Cell Biol*, 108, 367-393.
- Mayor, S., Parton, R. & Donaldson, J. (2014). Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6 (6), pii: a016758.
- Mayor, S. & Riezman, H. (2004). Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (2), 110-20.
- Mellman, I. & Nelson, W. (2008). Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (11), 833-45.
- Millon-Frémillon, A., Bouvard, D., Grichine, A., Manet-Dupé, S., Block, M. & Albiges-Rizo, C. (2008). Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent β 1-integrin affinity. *J Cell Biol*, 180 (2), 427-441.
- Miranti, C. & Brugge, J. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol*, 4 (4), E83-90.
- Misfeldt, D., Hamamoto, S. & Pitelka, D. (1976). Transepithelial transport in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73 (4), 1212-6.

- Mishra, R., Grzybek, M., Niki, T., Hirashima, M. & Simons, K. (2010). Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (41), 17633-8.
- Mitchell, J., Brown, W., Woodside, D., Vanderslice, P. & McIntyre, B. (2009). Clustering T cell GM1 lipid rafts increases cellular resistance to shear on fibronectin through changes in integrin affinity and cytoskeletal dynamics. *Immunol Cell Biol*, 87 (4), 324-336.
- Mostov, K., de Bruyn Kops, A. & Deitcher, D. (1986). Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis. *Cell*, 47 (3), 359-64.
- Müsch, A. (2004). Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic*, 5 (1), 1-9.
- Nabi, I., Shankar, J. & Dennis, J. (2015). The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci*, 128, 2213-9.
- Nandrot, E., Silva, K., Scelfo, C. & Finnemann, S. (2012). Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of $\alpha v \beta 5$ integrin. *Biol Cell*, 104 (6), 326-41.
- Nickel, W. & Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (2), 148-55.
- Nieminen, J., Kuno, A., Hirabayashi, J. & Sato, S. (2007). Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 282, 1374-83.
- Nishimura, T. & Kaibuchi, K. (2007). Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Dev Cell*, 13 (1), 15-28.
- Ochieng, J., Leite-Browning, M. & Warfield, P. (1998). Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 246 (3), 788-91.
- Olson, B. & Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Cell Sci*, Unit 3.4.
- Orlandi, P. & Fishman, P. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol*, 141 (4), 905-15.
- Orzech, E., Cohen, S., Weiss, A. & B, B. A. (2000). Interactions between the exocytic and endocytic pathways in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, 275 (20), 15207-19.

- Paladino, S., Pocard, T., Catino, M. & Zurzolo, C. (2006). Gpi-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J Cell Biol*, 172 (7), 1023-34.
- Parczyk, K. & Koch-Brandt, C. (1991). The role of carbohydrates in vectorial exocytosis. The secretion of the gp80 glycoprotein complex in a ricin-resistant mutant of MDCK cells. *FEBS Letters*, 278 (2), 267-70.
- Partridge, E., Roy, C. L., Guglielmo, G. D., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., ... Dennis, J. (2004). Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science*, 306 (5693), 120-4.
- Petrich, B., Fogelstrand, P., Partridge, A., Yousefi, N., Ablooglu, A., Shattil, S. & Ginsberg, M. (2007). The antithrombotic potential of selective blockade of talin-dependent integrin alpha iib beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) activation. *J Clin Invest*, 117 (8), 2250-9.
- Polishchuk, R., Pentima, A. D. & Lippincott-Schwartz, J. (2004). Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat Cell Biol*, 6 (4), 297-307.
- Praetorius, J., Backlund, P., Yergey, A. & Spring, K. (2001). Specific lectin binding to beta1 integrin and fibronectin on the apical membrane of madin-darby canine kidney cells. *J Membr Biol*, 184, 273-81.
- Priglinger, C., Szober, C., Priglinger, S., Merl, J., Euler, K., Kernt, M., ... Hauck, S. (2013). Galectin-3 induces clustering of CD147 and integrin-beta1 transmembrane glycoprotein receptors on the RPE cell surface. *PLoS One*, 8, e70011.
- Rehm, H. & Letzel, T. (2010). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics* (6. Auflage Aufl.). Heidelberg: Spektrum.
- Rigot, V., André, F., Lehmann, M., Lissitzky, J., Marvaldi, J. & Luis, J. (1999). Biogenesis of $\alpha 6\beta 4$ integrin in a human colonic adenocarcinoma cell line. *FEBS Journal*, 261 (3), 659-666.
- Rindler, M., Ivanov, I., Plesken, H., Rodriguez-Boulán, E. & Sabatini, D. (1984). Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, 98 (4), 1304-19.
- Rodriguez-Boulán, E., Kreitzer, G. & Müsch, A. (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (3), 233-47.
- Rodriguez-Boulán, E., Paskiet, K., Salas, P. & Bard, E. (1984). Intracellular transport of influenza virus hemagglutinin to the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, 98 (1), 308-19.

- Ross, M. & Pawlina, W. (2007). *Histology. A text and atlas* (5. Auflage Aufl.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Rothlein, R., Dustin, M., Marlin, S. & Springer, T. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol*, 137 (4), 1270-4.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanyal, S. & Menon, A. (2009). Specific transbilayer translocation of dolichol-linked oligosaccharides by an endoplasmic reticulum flippase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (3), 767-72.
- Saravanan, C., Liu, F., Gipson, I. & Panjwani, N. (2009). Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on alpha3beta1 integrin. *J Cell Sci*, 122, 3684-93.
- Sato, S., Burdett, I. & Hughes, R. (1993). Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum - golgi complex. *Exp Cell Res*, 207, 8-18.
- Schneider, D. (2011). *Unkonventionelle Sekretion und Endozytose von Galectin-3* (Dissertation). Philipps-Universität Marburg.
- Schneider, D., Greb, C., Koch, A., Straube, T., Elli, A., Delacour, D. & Jacob, R. (2010). Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *Eur J Cell Biol*, 89, 788-98.
- Schoenenberger, C., Zuk, A., Zinkl, G., Kendall, D. & Matlin, K. (1994). Integrin expression and localization in normal MDCK cells and transformed MDCK cells lacking apical polarity. *J Cell Biol*, 107, 527-41.
- Seetharaman, J., Kanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S. & Rini, J. (1998). X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-A resolution. *J Biol Chem*, 273 (21), 13047-52.
- Sharon, N. & Lis, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, 77 (4053), 949-59.
- Sharon, N. & Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14 (11), 53R-62R.
- Shattil, S., Kim, C. & Ginsberg, M. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11 (4), 288-300.
- Stanley, P. (2011). Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3 (4), pii: a005199.

- Stechly, L., Morelle, W., Dessein, A., André, S., Grard, G., Trinel, D., ... Huet, G. (2009). Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic*, 10 (4), 438-50.
- Steentoft, C., Vakhrushev, S., Joshi, H., Kong, Y., Vester-Christensen, M., Schjoldager, K., ... Clausen, H. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO Journal*, 32 (10), 1478-88.
- Straube, T., Elli, A., Greb, C., Hegele, A., Elsässer, H., Delacour, D. & Jacob, R. (2011). Changes in the expression and subcellular distribution of galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, doi: 10.1186/1756-9966-30-89.
- Straube, T., von Mach, T., Hönig, E., Greb, C., Schneider, D. & Jacob, R. (2013). pH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells. *Traffic*, 14, 1014-27.
- Sun, X., Fu, Y., Gu, M., Zhang, L., Li, D., Li, H., ... Zhu, Y. (2016). Activation of integrin $\alpha 5$ mediated by flow requires its translocation to membrane lipid rafts in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 (3), 769-74.
- Tadokoro, S., Shattil, S., Eto, K., Tai, V., Liddington, R., de Pereda, J., ... Calderwood, D. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 302 (5642), 103-6.
- Teckchandani, A., Mulkearns, E., Randolph, T., Toida, N. & Cooper, J. (2012). The clathrin adaptor Dab2 recruits EH domain scaffold proteins to regulate integrin $\beta 1$ endocytosis. *Mol Biol Cell*, 23 (15), 2905-16.
- Teichberg, V., Silman, I., Beitsch, D. & Resheff, G. (1975). A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of electrophorus electricus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72 (4), 1383-7.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*, 166 (12), 7309-18.
- Tiwari, S., Askari, J., Humphries, M. & Bulleid, N. (2011). Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking. *J Cell Sci*, 124 (10), 1672-1680.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (9), 4350-4.
- Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (4), 285-93.

- Urban, J., Parczyk, K., Leutz, A., Kayne, M. & Kondor-Koch, C. (1987). Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line. *J Cell Biol*, 105, 2735-43.
- Ussar, S., Moser, M., Widmaier, M., Rognoni, E., Harrer, C., Genzel-Boroviczeny, O. & Fässler, R. (2008). Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. *PLoS Genet*, 4 (12), e1000289.
- Valdembri, D., Caswell, P., Anderson, K., Schwarz, J., König, I., Astanina, E., ... Serini, G. (2009). Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol*, 7 (1), e25.
- van Meer, G. & Simons, K. (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem*, 36 (1), 51-8.
- van Meer, G., Stelzer, E., van Resandt, R. W. & Simons, K. (1987). Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *J Cell Biol*, 105 (4), 1623-35.
- von Mach, T., Carlsson, M., Straube, T., Nilsson, U., Leffler, H. & Jacob, R. (2013). Ligand binding and complex formation of galectin-3 is modulated by pH variations. *Biochem J*, 457, 107-15.
- Welling, P. & Weisz, O. (2010). Sorting it out in endosomes: An emerging concept in renal epithelial cell transport regulation. *Physiology (Bethesda)*, 25 (5), 280-92.
- Whittaker, C. & Hynes, R. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell*, 13 (10), 3369-87.
- Winyard, P., Bao, Q., Hughes, R. & AS, A. W. (1997). Epithelial galectin-3 during human nephrogenesis and childhood cystic diseases. *J Am Soc Nephrol*, 8 (11), 1647-57.
- Xiong, J., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D., ... Arnaout, M. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*, 294 (5541), 339-45.
- Yang, B. & Rizzo, V. (2013). Shear stress activates eNOS at the endothelial apical surface through β 1-containing integrins and caveolae. *Cell Mol Bioeng*, 6 (3), 346-354.
- Yeaman, C., Gall, A. L., Baldwin, A., Monlauzeur, L., Bivic, A. L. & Rodriguez-Boulán, E. (1997). The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol*, 139 (4), 929-40.
- Yuan, Y., Wu, L., Shen, S., Wu, S. & Burdick, M. (2016). Effect of alpha 2,6 sialylation on integrin-mediated adhesion of breast cancer cells to fibronectin and collagen IV. *Life Sci*, 149, 138-45.

- Zhang, K. & Chen, J. (2012). The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr*, 6 (1), 20-9.
- Zhuo, Y., Chammas, R. & Bellis, S. (2008). Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 283, 22177-85.
- Zuk, A. & Matlin, K. (1996). Apical beta 1 integrin in polarized MDCK cells mediates tubulocyst formation in response to type I collagen overlay. *J Cell Biol*, 109, 1875-89.
- Zuk, A. & Matlin, K. (2002). Induction of a laminin isoform and alpha(3)beta(1)-integrin in renal ischemic injury and repair in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283 (5), F971-84.

A. Anhang

A.1. Herleitungen und weitere Ergebnisse

A.1.1. Einordnung der im Experiment verwendeten Galektin-3-Konzentration

Im Folgenden soll das Mengenverhältnis von endogenem Galektin-3 und im Experiment verwendeten rekombinanten Galektin-3 abgeschätzt und eingeordnet werden. Lindstedt et al. (1993) ermittelten eine Menge von $5\text{ }\mu\text{g}/10\text{ cm}^2$ Galektin-3 in konfluente MDCK-Zellen. Werden diese in 1 mL Lysepuffer aufgenommen, ergibt sich entsprechend eine Galektin-3-Konzentration von $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden meist $1.5\text{ }\mu\text{M}$ (oder $40\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) rekombinantes, humanes Galektin-3 eingesetzt. Die eingesetzte Galektin-3-Menge war also achtmal größer, als die in MDCK-Zellen endogenen Galektin-3-Level. Humane Serum-Galektin-3-Level wurden im Zusammenhang der Erforschung zahlreicher Krankheitsbilder erhoben. Hier ist Galektin-3 im unteren Nanogramm-Bereich (ng/mL) zu detektieren. In Tabelle A.1 sind einige Messwerte verschiedener Studien aufgelistet.

Gruppe	Galektin-3	Literatur
Kontrolle	$100\text{ pg}/\text{mL}$	Gendy et al., 2014
Blasenkarzinom	$840\text{ pg}/\text{mL}$	
Zystitis	$380\text{ pg}/\text{mL}$	
Kontrolle	$5.40\pm 0.34\text{ ng}/\text{mL}$	Tian et al, 2016
Epilepsie	$6.67\pm 0.34\text{ ng}/\text{mL}$	

Kontrolle	5.52±1.9 ng/mL	Askan et al., 2016
Koronare Herzkrankheit	12.96±4.92 ng/mL	
Kontrolle	0.79±0.01 ng/mL	Korkmaz et al., 2016
Kolorektalkarzinom	5.9±0.69 ng/mL	
Kontrolle	0.7±0.5 ng/mL	Uluca et al., 2015
Chronische Hepatitis B	16.5±3.6 ng/mL	
Inaktive Träger	1.1±0.3 ng/mL	
Kontrolle	0.86±0.20 ng/mL	Zhou et al., 2014
Osteosarkom	2.35±0.91 ng/mL	
Kontrolle	8.9±0.28 ng/mL	Eisa et al., 2015
Leberzirrhose	10.11±0.46 ng/mL	
Hepatozelluläres Karzinom	11.2±0.43 ng/mL	
Kontrolle	2491.3±812.0 ng/dL	Yilmaz et al., 2014
Polyzystisches Ovar-Syndrom	3588.7±1566.9 ng/dL	
Kontrolle	1.3±1.1 ng/mL	Koca et al., 2014
Systemische Sklerose	4.6±5.8 ng/mL	
Systemischer Lupus erythematodes	14.0±11.6 ng/mL	
Kontrolle	119±16 ng/mL	Senapati et al., 2011
Pankreaskarziom, keine Metastasen	197±28 ng/mL	
Pankreaskarziom, mit Metastasen	279±29 ng/mL	
Kontrolle	1.1 ng/mL	Sakaki et al., 2008
Kontrolle	584 pg/mL	Sakaki et al., 2008
Blasenkarzinom	1068 pg/mL	
Kontrolle	6.9 ng/mL	Vereecken et al., 2006
Melanom	12 ng/mL	

Tabelle A.1.: Humane Serum-Galektin-3-Level.

A.1.2. Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von Galektin-3 Co-Präzipitaten

Zur Identifizierung von Galektin-3-Bindepartnern an der apikalen Plasmamembran wurden hGal3-Biotin-Präzipitate mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert (siehe 2.8.7 und 3.2.1). Im folgenden sind die vollständigen Trefferlisten der massenspektrometrischen Auswertungen aufgelistet.

Bande	Ergebnis
1	PREDICTED: lymphocyte antigen 75 isoform X1 and X2 [Canis lupus familiaris]
2	PREDICTED: thrombospondin-1 [Canis lupus familiaris]
3	PREDICTED: integrin alpha-2 [Canis lupus familiaris]
4	keratin, type I cytoskeletal 19 [Canis lupus familiaris]
5	Galectin-3 [Canis lupus familiaris]
6	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 18 isoform 1 [Canis lupus familiaris]
7	keratin, type I cytoskeletal 19 [Canis lupus familiaris]
8	Clusterin/gp80 [Canis lupus familiaris]
9	annexin A2 [Canis lupus familiaris]
10	beta-galactosides-binding lectin, partial [Canis lupus familiaris]
11	Galectin-3 [Homo sapiens]

Tabelle A.2.: Trefferliste Massenspektrometrie Nr.1.

Treffer	Ergebnis
1	galectin 3 [Nomascus leucogenys] LGAL3S3
2	prostaglandin F2 receptor inhibitor [Canis lupus familiaris] PTGFRN
3	galectin-3 binding protein [Canis lupus familiaris] LGAL3S3BP
4	intracellular adhesion molecule 1 [Canis lupus familiaris] ICAM1
5	solute carrier familiy 3 (amino acid transporter heavy chain) member 2 [Canis lupus familiaris] SLC3A2
6	integrin alpha-2 [Canis lupus familiaris] ITGA2
7	integrin alpha-3 [Canis lupus familiaris] ITGA3
8	lymphocyte antigen 75 [Canis lupus familiaris] LY75
9	low density lipoprotein receptor related protein 1 [Canis lupus familiaris] LRP1

Tabelle A.3.: Trefferliste Massenspektrometrie Nr.2.

A.2. Kontrollen

A.2.1. Galektin-3 kann den PET-Filter überqueren

Für einige der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Experimente wurden MDCK-Zellen auf PET-Filter kultiviert und rekombinantes Galektin-3 dem apikalen oder basolateralen Kompartiment zugesetzt. Um mit der basolateralen Membran zu interagieren, muss Galektin-3 zunächst den Filter überqueren. Um *in vitro* zu überprüfen, ob Galektin-3 dazu in der Lage ist, wurde ein Filtereinsatz mit 1.5 μM Galektin-3-Alexa555 in PBS in der basolateralen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. In der apikalen Kammer befand sich zu Versuchsbeginn nur PBS. Vom apikalen Überstand wurden in regelmäßigen Abständen 50 μL abgenommen und die Alexa555-Intensität im Tecan Mikroplattenleser gemessen. Im Laufe der Zeit wurde ein Anstieg der Alexa555-Intensität im apikalen Überstand gemessen (siehe Abbildung A.1). Aufgrund dieser Beobachtung kann davon ausgegangen werden, dass rekombinantes Galektin-3 per se in der Lage ist, den PET-Filter zu überqueren.

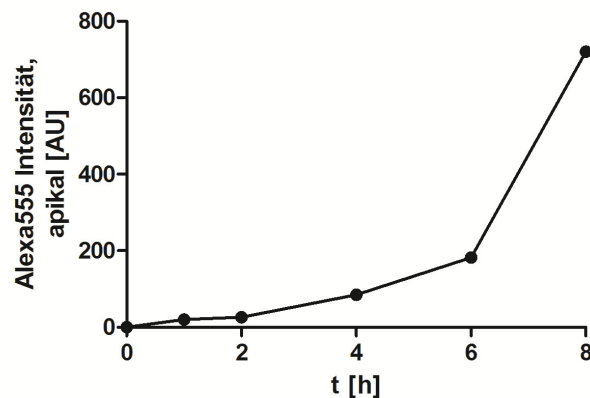


Abbildung A.1.: Galektin-3 kann den Filter überqueren. Die basolaterale Kammer einer 6-Lochplatte mit PET-Filtereinsatz wurde zu Versuchbeginn mit $1.5 \mu\text{M}$ hGal3-Alexa555 versetzt. Die Alexa555-Intensität wurde im apikalen Überstand im Tecan Mikropplattenleser bei einer Anregung von 535 nm und einer Emission von 590 nm gemessen.

A.2.2. Funktionstest von aufgereinigtem Galektin-3

Um die Funktionalität von rekombinantem Galektin-3 zu überprüfen, wurde nach der Aufreinigung dessen Fähigkeit getestet, große Komplexe mit Glykoliganden auszubilden. Als Ligand wurde hier das Glykoprotein Asialofetuin (ASF) eingesetzt. Wie in Abbildung A.2A dargestellt, wurde bei gleichbleibender ASF-Konzentration ein Anstieg der Turbidität mit zunehmender Galektin-3-Konzentration beobachtet. Es stellte sich hierbei kein Maximum ein. Bei gleichbleibender Galektin-3-Konzentration und verschiedenen ASF-Konzentrationen dagegen, konnte zunächst eine Zunahme der Turbidität gemessen werden. Nach Erreichen eines Absorptionsmaximums wurde ein Rückgang der Komplexbildung bei höheren ASF-Konzentrationen beobachtet (A.2B).

Dieses Verhalten wurde auch von Lepur, Salomonsson et al. (2012) beschrieben, sodass bei übereinstimmenden Beobachtungen von der Funktionalität des aufgereinigten Galektin-3 auszugehen war, und es für weitere Versuche eingesetzt wurde.

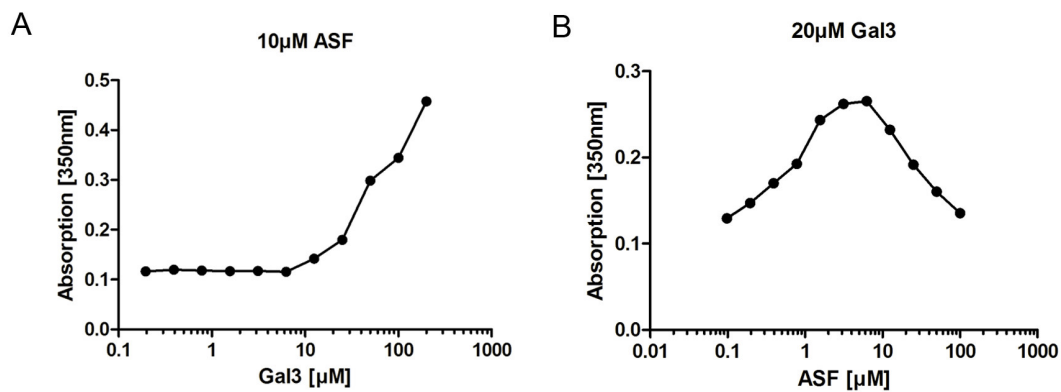


Abbildung A.2.: Oligomerisierung von Galektin-3. Turbiditätsbestimmung durch Messung der Absorption bei 350 nm von A) 0 bis 200 µM Galektin-3 und 10 µM ASF und B) 0 bis 100 µM ASF und 20 µM Galektin-3.

A.2.3. Funktionstest von Eisen-beladenem und Fluoreszenz-markierten Transferrin

Canines Transferrin wurde als Kontrolle für die Endozytose an der basolateralen Membran von auf PET-Filtern kultivierten MDCK-Zellen verwendet (siehe Abschnitt 3.7.1). Bevor dieses nach dem gleichen Verfahren wie rekombinantes Galektin-3 mit einem Alexa-Fluorophor gekoppelt wurde, wurden zunächst dessen Bindungsstellen für Eisen beladen (siehe Abschnitt 2.9.2). Anschließend erfolgte ein Funktionstest von Alexa-markiertem Holo-Transferrin. Dazu wurden sowohl eine Eisenüberschuss- als auch eine Eisenmangelsituation simuliert. Hierfür wurden polare MDCK-Zellen über Nacht mit 100 µM Eisenammoniumcitrat (FAC), beziehungsweise 100 µM Deferoxamin (DFO) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 30-minütige Endozytose von Holo-Transferrin-Alexa555 (Tf-Alexa555). Wie in Abbildung A.3 dargestellt, war die Alexa555-Fluoreszenzintensität in FAC-behandelten Zellen geringer im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Höhere Intensitäten von Tf-Alexa555 konnten dagegen bei DFO-behandelten MDCK-Zellen mit Eisenmangel registriert werden.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Zellen die Aufnahme des rekombinanten Holo-Transferrins je nach Eisenbedarf regulieren. Demnach wurde angenommen, dass das vorliegende rekombinante Protein funktionell war und für weitere Experimente verwendet werden kann.

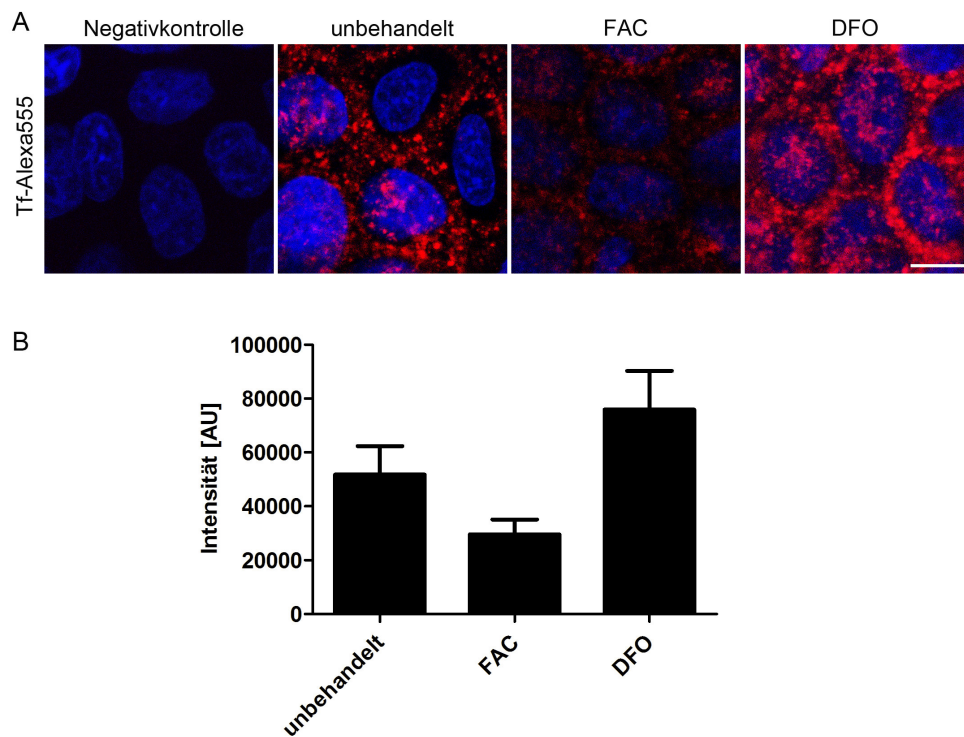


Abbildung A.3.: Validierung von Fluoreszenz-markiertem Holo-Transferrin. A) Polare MDCK-Zellen wurden zunächst über Nacht mit jeweils 100 μ M FAC oder DFO behandelt bevor die Endozytose von 1.5 μ M Transferrin-Alexa555 (rot) für 30 min bei 37 °C induziert wurde. Maßstab 7.5 μ m. B) Quantifizierung von A. Es wurden die Alexa555-Intensitäten von drei Bildern pro Bedingung mit ImageJ gemessen. Mittelwert + SD. n=1.

A.3. Daten die durch Betreuung von Studenten entstanden sind

A.3.1. Glykosylierung von Clusterin/gp80

Die Glykanmodifikationen von apikal und basolateral sekretiertem Clusterin/gp80 wurden mit Hilfe von Glykosidasen untersucht. Aufgrund der beobachteten PNGase F- und Neuraminidase-Sensitivität konnte gezeigt werden, dass Clusterin/gp80 komplexe *N*-Glykane mit terminalen Sialinsäuren trägt (Abbildung A.4).

A.3.2. Interaktion von Galektin-3 und Clusterin/gp80

Für Galektin-3 und Clusterin/gp80 konnte eine Interaktion im Gesamtzelllysats sowie im apikalen Überstand von MDCK-Zellen durch Co-Immunopräzipitation gezeigt werden (Abbildung A.5A). Desweiteren präzipitierte Clusterin/gp80 mit Membran-gebundenem rekombinantem Galektin-3 an der apikalen Domäne (siehe A.5B).

A.3.3. Sekretion von Clusterin/gp80 in MDCK Δ Gal3-Zellen

Die Sekretion von Clusterin/gp80 findet in MDCK Δ Gal3-Zellen wie in WT-Zellen vorwiegend an der apikalen Plasmamembran statt (Abbildung A.6).

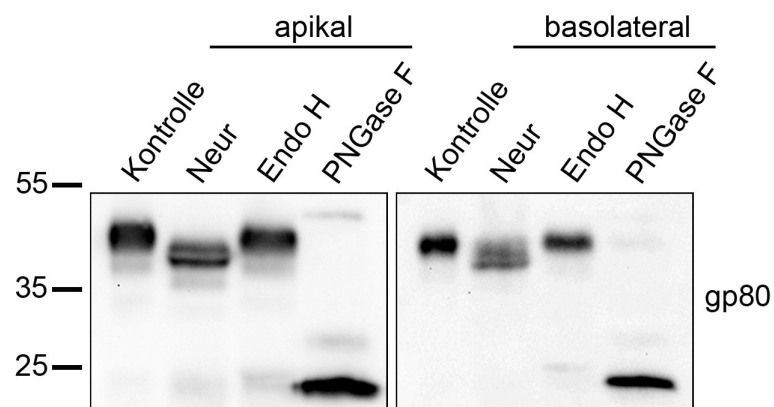


Abbildung A.4.: Clusterin/gp80 besitzt komplex glykosylierte N-Glykane. Apikale und basolaterale Zellkulturüberstände wurden nach 4 h Sekretion mit Glykosidasen behandelt, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und Clusterin/gp80 im Westernblot detektiert. n=3. Durchgeführt von Karla Janssen (2014), Bachelorarbeit: „Polare Sekretion von Clusterin in Epithelzellen der Niere und des Darms“. Neur = Neuraminidase (Sialidase), Endo H = Endoglykosidase H, PNGase F = Peptide:N-Glycosidase F. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

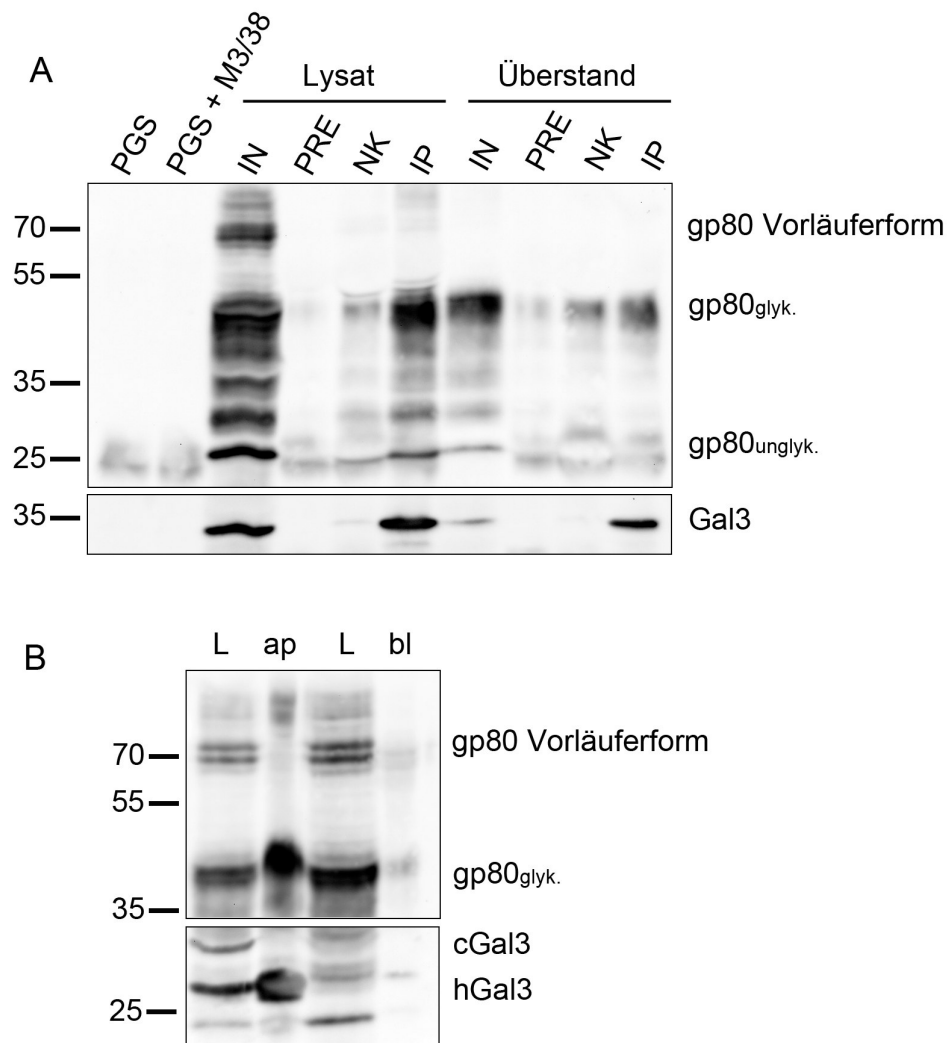


Abbildung A.5.: Clusterin/gp80 interagiert mit Galektin-3. **A)** Galektin-3 wurde in Gesamtzelllysaten und im apikalen Zellkulturüberstand nach 4 h Sekretion durch Co-Immunpräzipitation (mit anti Galektin-3 M3/38 Antikörper) isoliert und co-präzipitierendes Clusterin/gp80 im Westernblot nachgewiesen. $n=3$. Durchgeführt von Theresa Rink und Rebecca Schilewa, Praktikum (2015). **B)** Die apikale Membrandomäne polarer MDCK-Zellen wurde mit $1.5 \mu\text{M}$ hGal3-Biotin für 30 min bei 4°C inkubiert. Membran-gebundenes Galektin 3 wurde mit Hilfe von Neutravidin-beads isoliert und co-präzipitierende Proteine per Immunoblot analysiert. $n=3$. Durchgeführt von Theresa Rink und Rebecca Schilewa, Praktikum (2015). PGS = Protein G Sepharose-beads, IN = Input (Lysat), PRE = *Preclearing*, NK = Negativkontrolle, IP = Immunpräzipitation, L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral, glyk. = glykosyliert, unglyk. = unglykosyliert. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

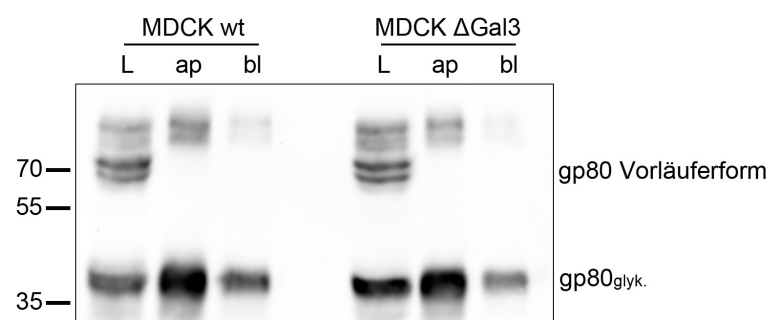


Abbildung A.6.: Galektin-3 ist nicht für die apikale Sekretion von Clusterin/gp80 notwendig. Apikale und basolaterale Zellkulturüberstände von auf PET-Filtern kultivierten MDCK WT- und Δ Gal3-Zellen wurden nach 4 h Sekretion gesammelt und Clusterin/gp80 mittels Westernblot detektiert. n=3. Durchgeführt von Hannah Tian, Praktikum (2016). L = Lysat, ap = apikal, bl = basolateral, glyk. = glykosyliert. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ARE	apikales Recyclingendosom
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
ASF	Asialofetuin
BEE	basolaterales frühes Endosom
CAM	<i>cell adhesion molecule</i> , Zelladhäsionsmolekül
CRE	gemeines Recyclingendosom
CLIC	<i>clathrin-independent carrier</i>
COPII	<i>coat protein complex II</i>
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
DFO	Deferoxamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPIV	Dipeptidylpeptidase IV
DSP	Dithiobis(Succinimidyl-Propionat)
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	frühes Endosom
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAC	<i>ferric ammonium citrate</i> , Eisenammoniumcitrat
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FKS	Fetales Kälberserum

Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glukose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSL	Glykosphingolipid
HA	Hämagglutinin
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
KD	<i>Knockdown</i>
KO	<i>Knockout</i>
HMWC	<i>high-molecular-weight cluster</i>
HRP	<i>horseradish</i> -Peroxidase
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllaktosamin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPH	Laktase-Phlorizin Hydrolase
MAL	<i>Maackia amurensis</i> Leukoagglutinin
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i>
MAH	<i>Maackia amurensis</i> Hämagglutinin
Man	Mannose
MDCK	Madin Darby <i>canine kidney</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
Mgat5	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamine: α -6-D-Mannosid- β 1,6 <i>N</i> -Acetylglucosaminyl- transferase V

MIDAS	<i>metal ion-dependent adhesion site</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTOC	<i>microtubule-organizing center, Mikrotubuli-organisierendes Zentrum</i>
MVK	Multivesikuläres Körperchen
NHS	<i>N-Hydroxysulfosuccinimidyl</i>
NO	<i>nitrogen monoxide, Stickstoffmonoxid</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PDM	<i>product of the difference from the mean</i>
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
PGS	Protein G-Sepharose
PI	Proteinase-Inhibitoren-Mix
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
PNGase F	Peptid:N-Glykosidase F
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin
RCA	<i>Ricinus communis</i> Agglutinin
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	<i>retinal pigment epithelium</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate, Natriumlaurylsulfat</i>
SEM	<i>standard error of the mean, Standardfehler</i>
SI	Sucrase-Isomaltase
Sia	Sialinsäure, <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
SNA	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>

SRP	<i>signal recognition particle</i> , Signalerkennungspartikel
TGF-β1	<i>transforming growth factor-β1</i> , Transformierender Wachstumsfaktor- β 1
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
u.a.	und andere
UDP	Uridin-Diphosphat
UMP	Uridin-Monophosphat
UDP-GlcNAc	UDP- <i>N</i> -Acetylgulcosamin
UV	Ultraviolett
(v/v)	<i>volume/volume</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis Virus</i>
VSV-G	<i>Vesicular stomatitis Virus</i> Glykoprotein G
WT	Wildtyp
(w/v)	<i>weight/volume</i>

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kontaktverbindungen in Epithelzellen	3
1.2	Synthese des Kernoligosaccharids	7
1.3	<i>N</i> -Glykanprozessierung	8
1.4	Mucin-Typ <i>O</i> -Glykosylierung	9
1.5	Endozytosemechanismen	13
1.6	Klassifizierung und Struktur der Galektine	14
1.7	Schematische Darstellung der Integrin-Untereinheiten	19
1.8	Heterodimerisierung der Integrine	20
1.9	Integrinaktivierung	24
1.10	Integrinliganden	25
2.1	Kultivierung von MDCK Typ II Zellen auf Filtereinsätzen	44

2.2	Schematischer Aufbau beim Westernblot	50
3.1	Sekretion von Galektin-3 in polaren MDCK-Zellen	66
3.2	Assoziation von Galektin-3 mit der Plasmamembran	68
3.3	Ermittlung apikaler Bindepartner für Galektin-3	71
3.4	Co-Immunpräzipitation von Integrinen und Galektin-3	72
3.5	Co-Präzipitation von Galektin-3 und Integrinen an den jeweiligen Membran- domänen	73
3.6	Inhibierung der Galektin-3-Integrin-Interaktion	74
3.7	Oberflächenverteilung von $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Integrin in MDCK-Zellen	76
3.8	Kolokalisation von Galektin-3 und $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Membrando- mäne	77
3.9	Lokalisation von $\beta 1$ -Integrin in der Mausniere	78
3.10	Potentielle Glykosylierungsstellen von $\beta 1$ -Integrin	79
3.11	Glykosidasebehandlung von apikal und basolateral lokalisiertem $\beta 1$ -Integrin	81
3.12	SNA-Bindung an $\beta 1$ -Integrin	82
3.13	Sekretion, Membranassoziation und Endozytose von Galektin-3 in MDCK RCA ^r - Zellen	85
3.14	Sortierung von $\beta 1$ -Integrin in MDCK RCA ^r -Zellen	86
3.15	Modulation der $\beta 1$ -Integrin-Expression durch Galektin-3	88
3.16	Modulation der Oberflächenverteilung von $\beta 1$ -Integrin durch Galektin-3 . . .	91
3.17	Zugabe von Galektin-3 führt zu einer Anreicherung von $\beta 1$ -Integrin an der apikalen Membran	92
3.18	Die Anreicherung von apikalem $\beta 1$ -Integrin durch Galektin-3 ist reversibel .	93
3.19	Modulation der Oberflächenverteilung von $\beta 1$ -Integrin durch Galektin-3-ver- mittelte Clusterbildung	94
3.20	Oberflächenverteilung von $\beta 1$ -Integrin bei Inhibition der Galektin-3-Endozytose	96
3.21	Lokalisation von $\beta 1$ -Integrin in der Galektin-3- <i>Knockout</i> Mausniere	99
3.22	Transportkinetik von $\beta 1$ -Integrin	101
3.23	Transportkinetik von $\beta 1$ -Integrin in Abhängigkeit von Galektin-3	102

3.24 Endozytose von Galektin-3 in MDCK-Zellen	106
3.25 Co-Endozytose von Galektin-3 und β 1-Integrin	107
3.26 Endozytose von β 1-Integrin unter Anwesenheit von Laktose	109
4.1 Modell apikaler Transportprozesse von Galektin-3 und β 1-Integrin	132
A.1 Galektin-3 kann den Filter überqueren	xiv
A.2 Oligomerisierung von Galektin-3	xv
A.3 Validierung von Fluoreszenz-markiertem Holo-Transferrin	xvi
A.4 Clusterin/gp80 besitzt komplex glykosylierte <i>N</i> -Glykane	xvii
A.5 Clusterin/gp80 interagiert mit Galektin-3	xix
A.6 Galektin-3 ist nicht für die apikale Sekretion von Clusterin/gp80 notwendig .	xx

Tabellenverzeichnis

2.1 Verwendete Chemikalien	34
2.2 Verbrauchsmaterialien	35
2.3 Verwendete Primärantikörper	36
2.4 Verwendete Sekundärantikörper	37
2.5 Für die Fluoreszenzmikroskopie verwendete Fluorophore	63
A.1 Humane Serum-Galektin-3-Level	xi
A.2 Trefferliste Massenspektrometrie Nr.1	xii
A.3 Trefferliste Massenspektrometrie Nr.2	xiii

Publikationen und Beiträge auf Konferenzen

Publikationen

- 2017 Hönig, E., Kreitzer G, Jacob R. Galectin-3 modulates apical surface levels of β 1-integrin in MDCK cells. *Manuskript in Vorbereitung*
- 2015 Hönig, E., Schneider, K., Jacob, R. Recycling of galectin-3 in epithelial cells. *Eur J Cell Biol*
- 2014 Hoff F, Greb C., Hollmann C., Hönig E., Jacob R. The large GTPase Mx1 is involved in apical transport in MDCK cells. *Traffic*
- 2013 Straube, T, von Mach, T., Hönig, E., Greb, C., Schneider, D., Jacob, R. pH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells. *Traffic*

Beiträge auf Konferenzen

- Vortrag Hönig, E., Jacob, R. Galectin-3 modulates apical surface levels of β 1-Integrin in MDCK cells. *EMBO Workshop Transducing glycan information into function: Lessons from and for galectins*, Mandelieu-la-Napoule, Frankreich (2016)
- Poster Hönig, E., Jacob, R. Analysis of β 1-Integrin as putative ligand for galectin-3 endocytosis at the apical plasma membrane. *SFB 593 Joint International Symposium Mechanisms of Cellular Compartmentalization*, Marburg (2014)
- Poster Hönig, E., von Mach T., Straube, T., Greb, C., Schneider, D., and Jacob, R. pH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cell. *ASCB Meeting*, New Orleans, USA (2013)

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Bauer S, Bauer UM, Brehm, Buchholz, Cherkasov, Czubayko, Daut, Dehnen, Elsässer, Fritz, Feuser, Garten, Greiner, Grzeschick, Hoyer, Jacob, Käuser, Koolman, Krebber, Löffler, Lill, Lillig, Lohöfer, Lohoff, Maisner, Moll, Mühlhoff, Müller, Müller-Brüsselbach, Öffner, Ocker, Parak, Pierik, Preisig-Müller, Röhm, Schäfer, Stehling, Suske, Vollmer, Westermann und Wrocklage.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Jacob für die Bereitstellung des interessanten und herausfordernden Dissertationsthemas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Ich bin dankbar für die zahlreichen Ratschläge und konstruktive Diskussionen, die mir während der praktischen Arbeit im Labor sowie bei der Erstellung dieses Manuskriptes weiter geholfen haben.

Ich bedanke mich bei der/dem Zweitgutachter/in für die Bewertung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Geri Kreitzer für die herzliche Aufnahme in ihrem Labor und ihre Rolle als Mentorin. Mein Dank gilt außerdem Dr. Stefan Baumeister für die Aufarbeitung und Analyse der massenspektrometrischen Daten, sowie Dr. Michael Carlsson für neue Anregungen bei der Glykananalyse.

Ich bedanke mich bei der gesamten AG Jacob mit ihren derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern. Besonderen Dank gilt Waltraud Ackermann und Martina Dienst dafür, dass sie durch ihre administrativen und technischen Arbeiten gemeinsam das Labor am Laufen halten. Herzlichen Dank an Natalia Kamm für ihre Hilfe und Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten während des Endspurts dieser Arbeit. Ich möchte mich bei den „alten Hasen“ Dominik Schneider, Tamara Straube und Tobias von Mach bedanken, für alles was ich von euch gelernt habe. Ich bedanke mich bei Florian Hoff für zahlreiche Tanzeinlagen zu Queensongs, viele lustige Momente im Labor („Miau!“), seine Unterstützung wissenschaftlicher und persönlicher Art und natürlich für den unvergesslichen Roadtrip von Key West nach New Orleans! Ich bedanke mich bei Christian Schink für die Pflege unserer Computer und für seine freundliche Hilfe bei Problemen mit selbigen. Mein Dank gilt auch Sebastian Bänfer für seine Diskussionsbereitschaft, seine Funktion als Mikroskopie-Experte und für das ein oder andere Feierabend-Bierchen. Außerdem möchte ich mich herzlich bei Jenny Dewis, Katharina Fritsch, Jana Riel und Karina Ringer für ihre stetige Hilfsbereitschaft und damit ihren Beitrag zu der guten Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Institut für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre. Nicht vergessen werden die vielen schöne Betriebsausflüge, Sommerfeste und Weihnachtsfeiern, sowie die besonderen Grillabende mit Sebastian Bänfer, Somsuvro Basu, Stefan Christ, Caro Goralik, David Fuhrmann, Karina Ringer und Christian Schink.

Vielen Dank an Sebastian Bänfer, Karina Ringer und Tobias von Mach für ihre Bereitschaft zum Korrekturlesen und ihren Beiträgen zur Verbesserung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch meinen lieben Mitbewohnerinnen für ihre Rücksichtnahme und die Motivation während dem Verfassen dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei all meinen Freunden, die mich während der Doktorandenzeit unterstützt und abgelenkt haben. Besonderen Dank gilt Ronja Hollstein, Martin Lackinger, Philip Munninghoff und Marta Uzarska für zahllose Sudhaus-Abende, Badeausflüge zum See, Kaffeekränzchen, Rockkonzerte, Urlaube und vieles mehr. Vielen Dank für eine großartige Zeit! Vielen Dank an David Fuhrmann und Joshua Balzer für die vielen Waldspaziergänge und Magdalena Hauburger für zahlreiche kulinarische Highlights mit Aperol Spritz. Ich bedanke mich auch bei den Jungs und Mädels des Marburger Kickbox-Vereins für ihre herzliche Aufnahme in ihrer Mitte und die so wichtige Möglichkeit im Training mal „Dampf ablassen“ zu können.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei meiner Familie für ihre Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit. Besonderen Dank geht an meine Eltern, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben und die mich genauso wie mein Bruder Moritz immer wieder motiviert haben. Ich bedanke mich bei meinen Großeltern Oma Marianne, Opa Helmut und Oma Paula für ihre vorbehaltlose Unterstützung und ihren stetigen Rückhalt. Ich bedanke mich außerdem bei meinem Dede Albrecht, für mein erstes Lichtmikroskop und die Begeisterung für die Naturwissenschaften, die er dadurch erweckt hat. Und für die Musik.